

モノクローナル抗体のリンパ球活性化機構の解析および癌化学療法への応用

著者	田中 稔之
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	178
URL	http://hdl.handle.net/10097/45979

モノクローナル抗体のリンパ球活性化 機構の解析および癌化学療法への応用

東北大学大学院薬学研究科

田 中 稔 之

目次

第1章 緒論	1
第2章 細胞増殖関連抗原 (gp125) の発現機構の解析	3
第1節 序論	3
第2節 ラットT細胞における細胞増殖関連抗原発現機構の解析	3
第3節 サイクリックヌクレオチドのラットT細胞増殖反応および gp125 抗原発現におよぼす影響	6
第4節 PMA + A23187 によるリンパ球活性化過程における gp125 抗原、 IL-2R および TrfR の発現 kinetics の検討	7
第5節 腫瘍細胞上の gp125 抗原の発現調節	9
第6節 活性化リンパ球の静止期への移行と活性化抗原発現の変動	10
第7節 考察	12
第3章 モノクローナル抗体を用いたラットCD3様抗原の同定	15
第1節 序論	15
第2節 ラットT細胞活性化に関連したモノクローナル抗体の作製	15
第3節 1F4 抗体のラットリンパ系細胞との反応	15
第4節 1F4 抗原の生化学的性状の解析	20
第5節 1F4 抗体によるラットT細胞の活性化の阻害	22
第6節 1F4 抗体によるラットT細胞の増殖誘導	24
第7節 考察	27
第4章 細胞増殖関連抗原に対するモノクローナル抗体の癌化学療法への応用	28
第1節 序論	28
第2節 細胞増殖関連抗原に対する CIL の作製	28
第3節 In vitro における IL および CIL の標的細胞に対する結合能の 検討	30
第4節 標的細胞に対する抗 gp125 抗体結合の Scatchard plot analysis	30

第5節	In vitro における抗 gp125 CIL の標的細胞傷害性	32
第6節	考 察	34
第5章	総 括	35
第6章	実験材料および方法	37
第1節	第2章付属実験	37
第2節	第3章付属実験	38
第3節	第4章付属実験	41
謝 辞		44
参考文献		45

本文で用いた略語

・ α - M M	; α -methyl-D-mannoside
・ B S A	; bovine serum albumin
・ C D	; cluster of differentiation
・ C o n A	; concanavalin A
・ c A M P	; cyclic AMP
・ c G M P	; cyclic GMP
・ C I L	; chemoimmunoliposomes
・ d b c A M P	; dibutyryl cAMP
・ d b c G M P	; dibutyryl cGMP
・ D S P	; dithiobissuccinimidyl propionate
・ D P P C	; dipalmitoylphosphatidylcholine
・ D P P E	; dipalmitoylphosphatidylethanolamine
・ E G T A	; ethyleneglycol bis(β -aminoethyl ester)-N, N, N',N',-tetraacetic acid
・ F A C S	; fluorescence activated cell sorter
・ F C S	; fetal calf serum
・ F I T C	; fluorescein isothiocyanate
・ g p	; glycoprotein
・ H E P E S	; N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane- sulfonic acid
・ H A T	; hypoxanthine, aminopterin, thymidine
・ I L	; immunoliposomes
・ I L - 1	; interleukin 1
・ I L - 2	; interleukin 2
・ I L - 3	; interleukin 3
・ I C ₅₀	; 50 % inhibiting concentration
・ 2 - M E	; 2-mercaptoethanol
・ m A b	; monoclonal antibody(ies)

• MBPE	; N-(m-maleimidobenzoyl) dipalmitoylphosphatidylethanolamine
• MBS	; m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester
• MHC	; major histocompatibility antigen complex
• MMC	; mitomycin C
• MLR	; mixed lymphocyte reaction
• MLV	; multilamellar vesicles
• NP-40	; nonidet P-40
• PAGE	; polyacrylamide gel electrophoresis
• PBS	; phosphate buffered saline
• PE	; phycoerythrin
• PMA	; phorbol myristate acetate
• R	; receptor (e.g., IL-2R)
• R/M FITC	; FITC conjugated rabbit immunoglobulins to mouse immunoglobulins
• R/R FITC	; FITC conjugated rabbit immunoglobulins to rat immunoglobulins
• sIg	; surface immunoglobulin
• SDS	; sodium dodecyl sulfate
• SPDP	; N-hydroxysuccinimidyl 3-(2-pyridyldithio)-propionate
• SUV	; small unilamellar vesicles
• TBS	; tris buffered saline
• TcR	; T cell receptor for antigen
• TdR	; thymidine deoxyribose
• Trf	; transferrin

第1章 緒論

近年のモノクローナル抗体 (mAb) 作製技術の確立は、fluorescence activated cell sorter (FACS) の開発と相まって細胞マーカーの免疫学的および生化学的解析に大きな進展をもたらした。さらに、遺伝子工学的手法とともに、細胞の分化・増殖に重要な役割をはたす細胞膜上の機能分子の解析にその威力を発揮している。

細胞の分化・増殖機構の解明は現代の生物学における中心課題のひとつである。生体は個々の細胞動態を厳密にコントロールすることにより、個体の恒常性を維持している。一方、悪性腫瘍は、細胞癌遺伝子の異常などにより引き起こされるが、その生物学的性状には不明な点が多く、その本態解明のためには正常細胞の分化・増殖機構の解析から得られる知見が重要となる。

今日、細胞の分化・増殖が免疫学や発癌といった医学、細胞生物学の共通課題となった背景には、上皮細胞、リンパ球あるいは造血細胞などの哺乳動物細胞の分化・増殖が、増殖因子あるいは分化因子といった一連のタンパク質群により統御されているという認識がある。そして、近年の遺伝子工学的手法により、これらの因子を code する遺伝子のクローニングがほぼ終結しつつある現在、研究の中心はそれらの受容体とそれを介する細胞内情報伝達へと移行している。その結果、刺激応答の初期過程の解析が進行し、細胞癌遺伝子産物が刺激伝達の流れの中で理解されつつある。しかし、interleukin 1 (IL-1)、IL-3 などが種々の標的細胞に対して、その分化段階あるいは代謝状況に応じた様々な応答を引き起こすことは、生理活性因子-受容体系により誘導される細胞応答が、受容体の発現により一義的に規定されないことを示している。

リンパ球は種々の分化段階をへて最終的な免疫担当細胞として機能しこれらの解析に適した場を提供しており、とりわけT細胞は免疫応答の中心的役割をはたしておりその解析が進んでいる。T細胞の分化・増殖において細胞膜上の分子は重要な役割をはたしている。即ち、1) 生理活性因子の受容体 あるいは、2) 細胞接着を介した直接的な細胞間相互作用の認識分子などとして機能する。

通常、T細胞の活性化において、抗原は "competence" signal を IL-2 は "progression" signal を与えると考えられている。即ち、抗原刺激は、IL-2 receptor (IL-2R) の発現を誘導することによりT細胞の IL-2 に対する反応性を規定し、さらに、IL-2 は transferrin receptor (TrfR) の発現を誘導するといったカスケードが想定され、活性化

早期に誘導される膜変化は重要な役割を有すると考えられている。

さらに、T細胞の分化・増殖には可溶性因子のみならず、細胞接着を介した直接的な相互作用が重要な役割を演じる。T細胞による抗原認識は、接着分子との共同のもとに、T細胞受容体 (TcR) が標的細胞上の主要組織適合性抗原複合体 (MHC) に結合した抗原を認識する。TcR は通常 α 鎖、 β 鎖からなる heterodimer が CD3 抗原系 (CD; cluster of differentiation) と複合体を形成することが知られている。

本研究では、以上の事実を踏まえ、モノクローナル抗体を用いて、正常および腫瘍細胞の分化・増殖機構の一端を明かとする目的で主としてリンパ球を解析の場とし、1) ラットおよびヒトの系において細胞増殖関連抗原として同定された分子量 125,000 の糖タンパク質 (gp125, gp; glycoprotein) の発現に關与する細胞内刺激伝達機構を種々の刺激剤を用いて解析した。また、活性化T細胞の静止期への移行に伴う gp125 の発現変化を解析した。2) ラット TcR complex を形成すると考えられる分子量 25,000のタンパク質を認識する 1F4 mAb を作製し対応抗原の生化学的性状および免疫学的な機能解析を行った。さらに、抗原特異的な癌化学療法モデルの確立を目的とし、3) 細胞増殖関連抗原 (gp125) に対する mAb を用い抗体修飾リポソームを作製し in vitro における抗腫瘍効果発現に要する条件を検討した。

第2章 細胞増殖関連抗原の発現機構の解析

第1節 序論

ラットおよびヒト膀胱癌細胞を免疫原として作製された mAb、B3⁽¹⁻⁴⁾ および HBJ127⁽²⁻⁵⁾ は、それぞれラットおよびヒト細胞上に発現し、分子構造および組織分布より homologue であると考えられる細胞増殖関連抗原 (gp125) を認識する。gp125 抗原は種々の腫瘍細胞を含む増殖期細胞上に検出され⁽¹⁻⁵⁾、この抗原発現はリンパ球活性化過程と密接に関連することが明かとされている^(3, 4)。

近年、抗原刺激により引き起こされるリンパ球の増殖応答の初期過程において protein kinase C の活性化および細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が重要な役割を果たすことが明かとされている⁽⁶⁻¹¹⁾。さらに、発癌プロモーターである phorbol ester は protein kinase C を選択的に活性化し⁽¹²⁻¹³⁾、また、calcium ionophore は細胞内にカルシウムイオンを導入することから、両者を用いることにより、細胞外からの刺激を細胞膜を bypass して伝達できることが知られている。

本章においては、まずリンパ球における gp125 抗原の発現機作を種々の刺激剤を用いて解析した。続いて、活性化リンパ球が細胞分裂を終了した後、再び静止期へ移行する過程の gp125 抗原の発現変化を解析した。

第2節 ラット T 細胞における細胞増殖関連抗原の発現機構の解析

gp125 抗原は、T 細胞活性化過程において、DNA 合成に先行し G_1 期に顕著な発現が誘導される。T 細胞の活性化初期過程には、protein kinase C の活性化と細胞内カルシウムイオン濃度の上昇の両者が重要な役割を果たしており、前者は phorbol ester である phorbol myristate acetate (PMA) により、後者は calcium ionophore A23187 により独立して刺激することができる。そこで、まず PMA と A23187 のラットナイロン非付着性脾細胞 (脾臓 T 細胞) の増殖誘導能を検討した (Fig. 1-1)。その結果、PMA 単独では DNA 合成は誘導されず、A23187 単独も 6 時間刺激では無効であったが、24 時間刺激を行った場合、高濃度で弱い DNA 合成が認められた。しかしながら、A23187 を PMA とともに加えると 24 時間刺激のみならず、6 時間刺激の場合も A23187 $0.3 \mu\text{M}$ 以上で顕著な DNA

合成の誘導が認められた。そこで以下の実験では相乗作用の明かな PMA 20 ng/ml および A23187 0.3 μ M を用いることとした。

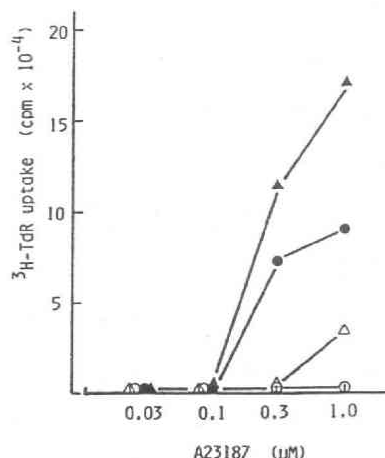


Fig. 1-1. Effect of PMA and/or A23187 on cellular DNA synthesis of rat T cells. Aliquots (0.2 ml) of a suspension containing nylon non adherent SD rat spleen cells at 2.5×10^6 cells/ml were cultured in the presence or absence of PMA (20 ng/ml) and various concentrations of A23187. After 6 or 24 hr, the cells were spun down and were cultured further in fresh culture medium in total 48 hr. Stimulated cellular DNA synthesis was assessed by [3 H]TdR incorporation. Stimulation without PMA: ○, 6hr; △, 24hr. Stimulation with PMA: ●, 6hr; ▲, 24 hr. [3 H]TdR incorporation on control cells cultured for 48 hr without reagents was 834 ± 45 cpm, and those in cells stimulated with PMA alone for 6 and 24hr were 905 ± 45 cpm and 1182 ± 57 cpm, respectively.

gp125 は前述したように、concanavalin A (Con A) などの mitogen および抗原などの刺激によりその発現が強く誘導される。そこで、PMA と A23187 による刺激が gp125 抗原の発現において、Con A などの刺激を代替できるか否かについて検討した (Fig.1-2)。ラット脾臓T細胞を24時間刺激した場合、PMA 単独はほぼ無効であり A23187 単独も弱い効果しか示さなかった。しかしながら、PMA と A23187 の両者を用いることにより顕著な gp125 の発現が誘導された (Fig.1-2A)。次に、両者の相乗作用をより明かとする目的で、刺激剤とともに6時間培養後、新たな培養液でさらに18時間培養した後の gp125 抗原の発現を検討した (Fig.1-2B)。その結果、PMA あるいは A23187 単独では無効であるが、両者を共存させた場合、6時間の短時間刺激で24時間刺激を行った場合と同様に顕著な gp125 抗原の発現が認められた。

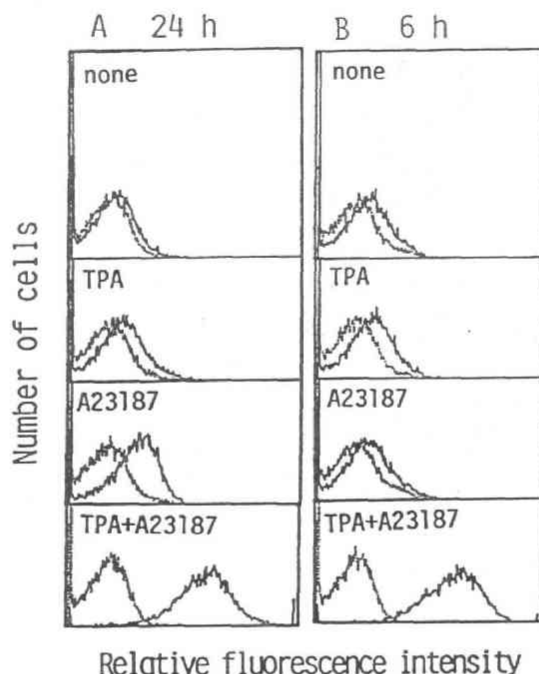


Fig. 1-2. Effect of PMA and A23187 on the appearance of B3 mAb-defined gp125 antigen on rat T cells. Aliquots (2 ml) of a suspension containing rat T cells at 2.5×10^6 cells/ml were stimulated with PMA (20 ng/ml), A23187 (0.3 μ M) or both. The cells were treated with biotinylated B3 mAb followed by avidin-FITC and assayed for the fluorescence intensity by means of FACS analyzer. A, cells cultured for 24 hr in the presence of the indicated reagent(s); B, cells were cultured for 6 hr in the presence of reagent(s) and for additional 18 hr in fresh culture medium. Control histogram shown with dotted lines represent the cells treated without mAb.

次に、PMA と A23187 による gp125 抗原発現における細胞外カルシウムイオンの役割を検討するため培養液に EGTA を加え同様な実験を行った (Fig. 1-3)。その結果、PMA と A23187 による gp125 抗原の発現誘導は EGTA により DNA 合成とともに強く阻害されたが、 CaCl_2 の添加により完全に回復することが示された。

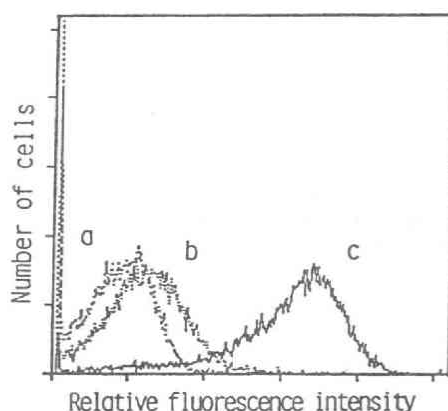


Fig. 1-3. Effect of EGTA on the induction of B3 antigen on rat T cells stimulated with PMA plus A23187. Rat T cells were stimulated for 6 hr with PMA plus A23187 as described Fig. 2B, and in the presence of EGTA (2 mM) or EGTA plus CaCl_2 (2 mM). The cells were cultured for additional 18 hr in fresh culture medium and were stained with biotinylated B3 mAb followed by avidin-FITC. The fluorescence intensity of the stained cells was assessed by means of FACS analyzer. a, cells stimulated with PMA plus A23187 in the presence of EGTA and stained without B3 mAb; b, the same cells as (a) but stained with B3 mAb; c, cells stimulated with PMA plus A23187 in the presence of EGTA plus CaCl_2 . [^3H]TdR incorporations in the cells cultured in the presence of EGTA and EGTA plus CaCl_2 were 251 ± 22 cpm and $68,078 \pm 3,620$ cpm, respectively.

第3節 サイクリックヌクレオチドのラットT細胞増殖反応および gp125 抗原発現におよぼす影響

cyclic AMP (cAMP) および cGMP などのサイクリックヌクレオチドは mitogen等によるリンパ球活性化における second messenger として作用することが知られている⁽¹⁴⁻¹⁶⁾。そこで、Con A および PMA + A23187 によるT細胞活性化過程における gp125 抗原の発現におよぼすサイクリックヌクレオチドの影響を dibutyryl cAMP (dbcAMP)、dbcGMP および adenylate cyclase 活性化剤である forskolin⁽¹⁷⁾ を用いて検討した (Table 1-1)。その結果、Con A 刺激によるラット脾臓T細胞の gp125 抗原誘導および DNA 合成に対して dbcAMP および forskolin は抑制的に作用した。一方、dbcGMP は Con A 刺激によるラット脾臓T細胞の DNA 合成を促進する傾向が認められたが gp125 抗原発現に対しては無効であった。また、これらのサイクリックヌクレオチド誘導体および forskolin は単独では無効であった。

次に、PMA + A23187 刺激時にこれらを共存させ、ラット脾臓T細胞応答に対する影響を検討した。本実験ではラット脾臓T細胞をPMA + A23187により6時間刺激した後、新たな培養液で培養を続け gp125 抗原発現および DNA 合成を検討した。その結果、Con A 反応に対してと同様に dbcAMP は gp125 抗原発現および DNA 合成に対して抑制的に作用した。また dbcGMP も Con A 反応に対してと同様な作用を示した。しかしながら、forskolin は終濃度 10 μ M まで、PMA + A23187 刺激による gp125 抗原発現および DNA 合成に対して無効であった。

Table 1-1 Effect of forskolin and cyclic nucleotides on proliferation and B3 antigen expression in Con A- or TPA/A23187-stimulated rat T cells.

Additional reagent	Concentration	Con A*		TPA plus A23187*	
		TdR uptake (cpm \pm SEM) ^f	B3 ⁺ cell (%) ^g	TdR uptake (cpm \pm SEM) ^h	B3 ⁺ cells (%) ⁱ
—	—	52,515 \pm 4,605	55.3	81,496 \pm 591	92.2
Forskolin	10 μ M	4,740 \pm 695**	32.2	77,604 \pm 3,066	89.3
dbc-AMP	1 mM	6,911 \pm 423**	11.5	27,164 \pm 875**	62.2
dbc-GMP	1 mM	77,722 \pm 396*	53.8	95,065 \pm 2,169*	92.4

*SD rat splenic T cells (5×10^4) were stimulated with Con A (5 μ g/ml) in the presence or absence of an additional reagent. *Same as in (a) but T cells were stimulated with TPA (20 ng/ml) plus A23187 (0.3 μ M). ^cCells were cultured in triplicate in the presence of reagent(s) for 48 h and were pulsed with [³H]TdR 4 h before cell harvesting. ^dCells having been cultured for 24 h in the presence of reagent(s) were stained with biotinylated B3 MoAb and were assayed for fluorescence intensity by means of flow cytometry. ^eCells having been cultured in the presence of reagent(s) for 6 h were cultured for an additional 42 h in the absence of reagent(s) and were treated as in (c). ^fCells having been cultured for 6 h in the presence of reagent(s) were cultured in the absence of reagent(s) for an additional 18 h and were treated as in (d). Asterisks show statistically significant differences (Student's *t* test) from the values of the additional reagent-free cultures: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

第4節 PMA + A23187 によるリンパ球活性化過程における gp125 抗原、IL-2R および TrfR の発現 kinetics の検討

分化・増殖過程でリンパ球は IL-2R や TrfR などの factor receptor や MHC class 2 抗原などを異なったタイミングで発現してくる^(18, 19)。ヒト gp125 抗原は Con A 刺激によるT細胞活性化過程において IL-2R や TrfR に先行して発現することが認められている。そこで、PMA + A23187 刺激による gp125、IL-2R および TrfR の発現 kinetics について検討した。その結果、ヒトの系においては Con A 刺激の場合と同様に gp125、IL-2R、TrfR の順に細胞表面に発現が認められた (Fig. 1-4)

次に、同様な発現 kinetics の検討をラットの系で行った (Fig. 1-5)。その結果、ラットの系では gp125 と TrfR の間には明かな発現 kinetics の解離が認められたが、gp125が IL-2R とはほぼ同様な発現 pattern を示した。この場合、刺激開始から6時間後までのさらに早期について発現を精査したが、明かな差異は認められなかった。

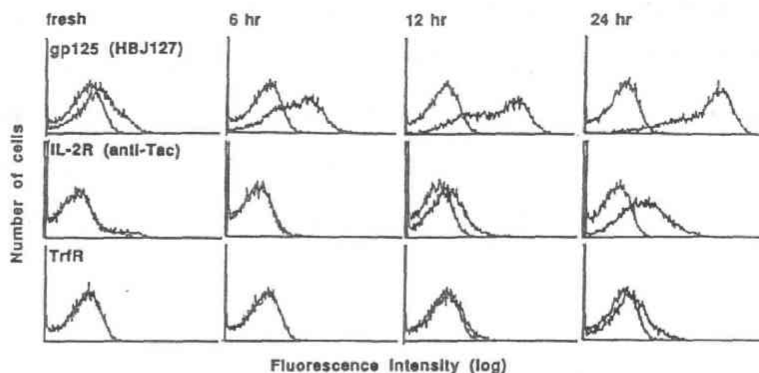


Fig. 1-4. Kinetics of appearance of HBJ127 antigen, IL-2R (CD25) and TrfR in the course of PMA plus A23187 stimulated culture of human peripheral blood lymphocytes. Lymphocytes (2.5×10^6 cells/ml) were cultured with PMA (20 ng/ml) plus A23187 ($0.3 \mu\text{M}$) as indicated periods and were stained with mAb and R/M FITC. Cell surface immunofluorescence was determined by means of FACS analyzer. A left side or overlapped curve in each figure showed the histogram obtained by the staining without mAb (control).

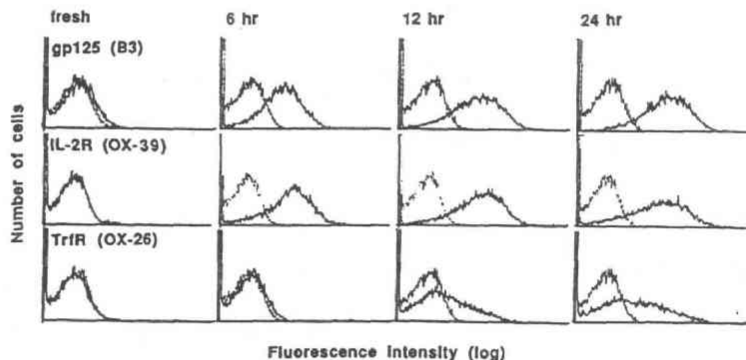


Fig. 1-5. Kinetics of appearance of antigens recognized by B3, OX-39 and OX-26 mAb in the course of PMA plus A23187 stimulated culture of rat splenic T cells. Rat T cells (2.5×10^6 cells/ml) were cultured for 6 hr in the presence of PMA (20 ng/ml) and A23187 ($0.3 \mu\text{M}$) and then further culture was performed in fresh culture medium (indicated time showed total culture periods). After the culture, the cells were stained with mAb and R/M FITC and were assayed fluorescence intensity by means of FACS analyzer. A left side or overlapped curve in each figure showed the histogram obtained by the staining without mAb (control).

第5節 腫瘍細胞上の gp125 抗原の発現調節

gp125 抗原は検索した限りすべての腫瘍細胞上に発現が認められている。そこで、これらの細胞上の gp125 の発現に及ぼす PMA および A23187 の影響を検討した。Molt-4 および Jurkat はいずれもヒト T 細胞白血病細胞であり gp125 は顕著に発現しているが、IL-2R の発現は認められない。まず、これらの細胞の gp125 および IL-2R に対する PMA の影響を検討した (Fig. 1-6)。Molt-4 を PMA とともに 24 時間培養すると、明かな IL-2R の誘導が認められたが、Jurkat には検出されなかった。一方、gp125 に対してはほとんど無効であった。

次に、非リンパ系組織由来の腫瘍細胞 AH-13、MGH-U1 について同様に検討した (Fig. 1-7)。ヒト膀胱癌細胞 MGH-U1 においてはほとんど gp125 抗原の発現に変化は誘導されず、またラット肝癌細胞 AH-13 においても A23187 によりわずかに gp125 抗原の発現が増大するなどの変化は認められたが、いずれの場合も刺激による変化は小さかった。

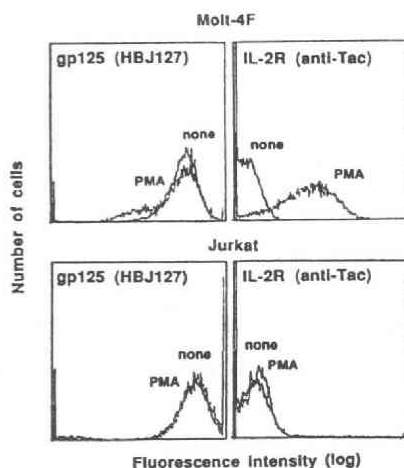


Fig. 1-6. Effect of PMA on the expression of gp125 antigen and IL-2R in MOLT-4 and Jurkat cells. Molt-4 and Jurkat cells (1×10^5 cells/ml) were cultured in the presence or absence of PMA (20 ng/ml) for 24 hr. After the culture, the cells were stained with HBJ127 (anti-human gp125) or anti-Tac (anti-human IL-2R) mAb followed by R/M FITC, and the fluorescently stained cells were analyzed by means of FACS analyzer. Curves shown in dotted lines represent control cells cultured in the absence of PMA.

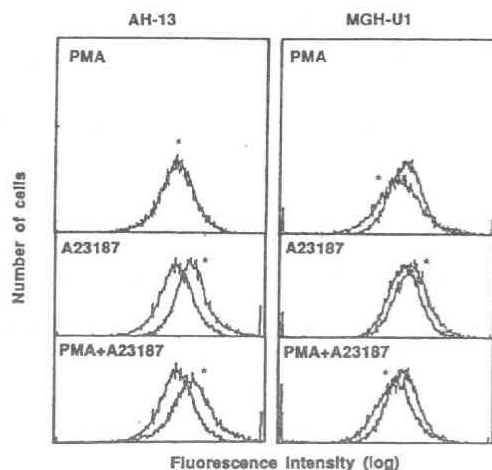


Fig. 1-7. Effect of PMA and/or A23187 on the expression of gp125 antigen in AH-13 rat hepatoma cells and MGH-U1 human bladder cancer cells. Cells were cultured in the presence or absence of PMA (20 ng/ml) and/or A23187 (0.3 μ M) for 24 hr. After the culture, cells were labeled with B3 (AH-13 cells) or HBJ127 (MGH-U1 cells) and stained with R/M FITC. Cell surface fluorescence was determined by means of FACS analyzer. *, fluorescence profiles obtained by cells treated reagent(s) as indicated.

第6節 活性化リンパ球の休止期への移行と活性化抗原発現の変動

Con A 刺激後のラット脾臓T細胞の細胞数変化の kinetics を Fig. 1-8 に示す。Con A 刺激3日後に、ラットT細胞にほぼ同調的な細胞分裂が認められた。この時新たな刺激を加えなければ、細胞は再び分裂することなく、除々に小型の静止期リンパ球に近い状況へと移行する⁽²⁰⁾。またこの段階で死細胞が除々に培養中に現れるため、小型リンパ球へと移行する細胞を解析するためには、Ficol を用いた不連続密度勾配遠心にて生細胞を濃縮することが必要であった。

次にこの静止状態にもどりつつある細胞の IL-2 および Con A による再刺激に対する応答性を検討した (Table 1-2)。その結果、これらの細胞の IL-2 に対する応答性は速やかに低下するが、Con A による再刺激に対してはほぼ同等に反応することが認められた。そこでこれらの細胞の gp125、IL-2R および TrfR の発現変化を細胞容積の変化とあわせて解析した (Fig. 1-9)。その結果、ラット脾臓T細胞は刺激後2日めに細胞容積が最大となり、3日めにはほぼ同調的に分裂した後に、除々に細胞容積が減少することが認められた。

この時、TrfR の発現は2日めで最大となり、3日めではすでに明かな消失が認められ、5日めの細胞ではほぼ未刺激の細胞と同様となった。これに対して、gp125 および IL-2R は細胞容積の減少に伴い、その発現は減少するが、5日めの細胞にも明かな残存が認められた。

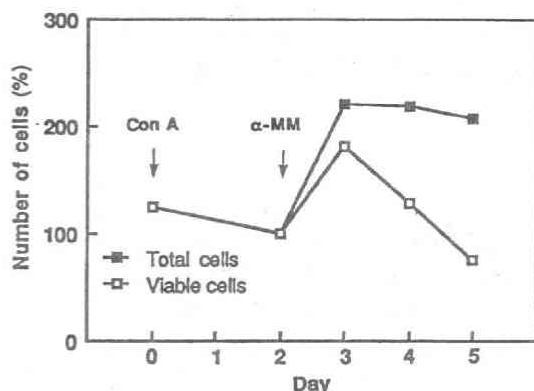


Fig. 1-8. Kinetics of cell division in the course of Con A stimulated rat T cells. Rat splenic T cells (2.5×10^6 cells/ml) were stimulated with Con A ($5 \mu\text{g/ml}$) for 48 hr and then were washed with $\alpha\text{-MM}$. T cells (2×10^6 cells/ml) were placed in the fresh culture medium and incubated for indicated periods. The number of cells was estimated by means of trypan blue dye exclusion test.

Table 1-2. Decrease of responsibility of Con A-induced T cell blast to IL-2.

Cells ^b	Stimulant ^a		
	none	IL-2 ^c	Con A ^d
2 day	4655 \pm 121	69515 \pm 1807	NT ^e
3 day	155 \pm 34	14079 \pm 1591	20382 \pm 2364 ^f
4 day	110 \pm 10	7224 \pm 339	31489 \pm 9383
5 day	118 \pm 54	7676 \pm 1427	22088 \pm 3202

a Cells were labeled with [^3H]TdR for 4 hr before harvest.

b Rat splenic T cells were stimulated with Con A ($5 \mu\text{g/ml}$) for 48 hr and then washed with $\alpha\text{-MM}$. Viable cells were enriched by discontinuous gradient centrifugation with Lymphoprep at indicated time and then used.

c Cells (1×10^4 cells) were stimulated with IL-2 (50 U/ml) for 24 hr and then harvested.

d Cells (5×10^4) were stimulated with Con A ($5 \mu\text{g/ml}$) for 48 hr and then harvested.

e Not tested.

f Cells were stimulated as in (c) but harvested after 24 hr culture.

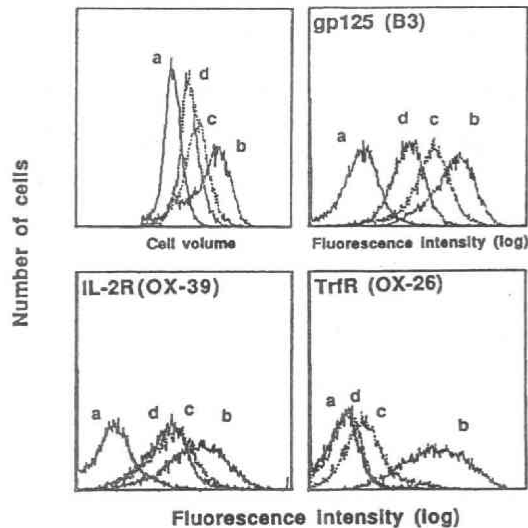


Fig. 1-9. Cell volume distribution and expression of cell surface gp125 antigen, IL-2R and TrfR of cultured rat T lymphocyte after initial Con A-activation. Rat splenic T cells (2.5×10^6 cells/ml) were stimulated with Con A (5 μ g/ml) for 2 days and then washed with α -MM. Cells were cultured for indicated periods and cell volume distribution and antigen expression were determined by means of FACS analyzer. a, cells without culture. b, 2 day. c, 3 day. d, 5 day.

第七節 考 察

静止期リンパ球への抗原あるいは mitogen 刺激は細胞の形態・機能変化につながる種々の細胞内生化学的反応を誘導する^(6-11, 21-23)。例えば、Con A はイノシトールリン脂質の分解による protein kinase C の活性化や細胞内カルシウムイオン濃度の上昇等を誘導する⁽²¹⁾。さらに、リンパ球の活性化にはサイクリックヌクレオチドの関与も知られている。通常、細胞内 cAMP 濃度の上昇はイノシトールリン脂質の分解抑制⁽²⁴⁾、IL-2 産生の抑制⁽²⁵⁾ および TrfR の発現誘導の阻害⁽²⁶⁾ 等により、リンパ球の活性化に対して抑制的に作用するが細胞内 cGMP 濃度の上昇はむしろ促進的に作用することが知られている⁽²⁷⁾。何れの刺激伝達系が最終的な増殖応答に結び付いているかは不明であるが、細胞増殖関連抗原 (gp125) の T 細胞活性化過程における発現には protein kinase C の活性化およびカルシウムイオンの動員の両者が必要であることが示され、gp125 の発現がリンパ球活性化と密接に関連することが示唆された。また cAMP 濃度の上昇は gp125 発現に対して抑制的に作用したが cGMP は影響を示さなかった。

リンパ球活性化過程において gp125 および IL-2R は G_{1s} 期に、TrfR はそれに引き続

く G_{1b} 期に発現することはすでに知られているが^(18, 19)、PMA + A23187 刺激したリンパ球における gp125、IL-2R および TrfR の発現 kinetics を検討した結果、ヒトでは、gp125 - IL-2R - TrfR の順に発現が認められたが、ラットでは gp125 と IL-2R の発現 kinetics に解離は認められなかった。しかし、いずれも TrfR の発現には先行した。ヒトおよびラットの系における差異の原因については以下の可能性が考えられる。

1) B3 mAb (抗ラット gp125) および HBJ127 mAb (抗ヒト gp125) あるいは MRC OX-39 mAb (抗ラット IL-2R) および anti-Tac mAb (抗ヒト IL-2R) が認識する epitope の性状による発現 kinetics の差異。2) ラットでは脾細胞由来の T 細胞を用いているのに対してヒトでは末梢血由来のリンパ球をもちいているため、等があげられる。今後、それぞれの mRNA の検出ができるようになればより詳細な解析が可能となると思われる。また現在、IL-2R は multi chain complex からなること⁽²⁸⁾が明かとされており、本研究で用いた mAb が認識する IL-2R 軽鎖の発現調節のみならず機能的 IL-2R を構成するために必要とされている IL-2R 重鎖 (p75) の発現調節についても考察を加える必要がある。

また分裂後の細胞上の gp125 についても検討した。活性化リンパ球の休止期への移行は、抗原への応答の終結や免疫学的記憶などに関連すると考えられる。しかし、細胞の "off signal" の実体については全く不明である。今回の実験では gp125 が TrfR に比して、長時間残存する傾向が認められ、この系では、post-activated cell が G_{1a} 期の細胞に相当する phenotype をもつことが示された。現在、post-activated cell あるいは memory cell marker となりうるものとして Tal、pgp-1 あるいは種々の接着分子が報告されているが⁽²⁹⁾、これらとあわせて検討することにより、休止期へ移行する細胞の解析が可能となるものと考えられる。

これまで述べたごとく、gp125 抗原はリンパ球活性化の非常に早期に発現するが、その機能的解析はほとんどなされていない。ヒトの系においては Haynes 等により作製された、HBJ127 mAb と相同抗原を認識すると考えられる 4F2 mAb が知られている^(30, 31)。また、マウスの系では、C57BL/6 の胸腺腫 EL-4 の IL-1 依存性 IL-2 産生を促進する mAb として得られた RL388 mAb がマウス gp125 抗原を認識することが報告されている⁽³²⁾。4F2 抗原を含め gp125 抗原は増殖期細胞以外に、腎臓の近位尿細管に極めて強い発現が認められる。この知見をもとに物質輸送系を検索した結果、4F2 mAb が Na^+/Ca^{2+} 交換体活性を阻害することが報告されている^(33, 34)。一方、4F2 抗原の重鎖の cDNA が cloning され、これは C 端側を細胞外にもち単一の膜貫通部位を有することが明かとされている

(35, 36)。この結果からは、ion channel を形成するとは考え難いが、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体の分子性状が明かでなく、また gp125 の軽鎖の構造が不明のため結論は得られていない。しかしながら、gp125 抗原の発現が多岐の組織に認められ、また細胞の活性化早期におこることは、その機能がきわめて universal なものであることを示唆する。今後は、mAb を用いて同定した gp125 分子の生物学的機能解析が研究の主題となるが、培養細胞ばかりでなく正常組織における抗原発現とその部位の機能的関連からの知見が gp125 分子全体像を把握するための重要な情報を提供するものと考えられる。

第3章 モノクローナル抗体を用いたラット CD3 様抗原の同定

第1節 序 論

T細胞に対するモノクローナル抗体 (mAb) は、そのサブセットの分類のみならず、それを規定する分化抗原の生化学的な解析を可能とした⁽³⁷⁻³⁹⁾。その結果、T細胞上のいくつかの表面抗原が signal 伝達に関与することが明かとなっている。とりわけ、T細胞の分化・増殖において CD3-TcR は中心的な役割を演じており、ヒトおよびマウスの系では、CD3-TcR complex に対する mAb が作製されており、その機能解析が数多くなされている⁽⁴⁰⁻⁵¹⁾。しかしながら、ラットの CD3-TcR complex については現在まではほとんど報告はない。本章では、筆者らが新たに作製した、ラット CD3 を認識すると考えられる 1F4 mAb を用い、その対応抗原の分布、生化学的性状および免疫学的機能について検討した。

第2節 ラットT細胞活性化に関連したモノクローナル抗体の作製

PMA + A23187 により活性化した F344 ラット脾臓T細胞で Balb/c マウスを免疫し、得られた脾細胞とマウスミエローマ細胞を常法により融合し、抗体産生ハイブリドーマを得た。これらの培養上清中の抗体を、1) F344 ラットT細胞と反応すること および 2) ラット膀胱癌細胞 BC47 と反応しないこと を基準にし、500 well 中 33 well を選択した。次にこれらの培養上清の F344 ラット脾細胞に対する PMA との co-stimulation assay にて 1F4 mAb (IgM- κ) を産生するハイブリドーマを選別した (Fig. 2-1)。1F4 mAb は、限界希釈法によりクローン化したハイブリドーマを移植したマウス腹水より精製して以下の実験に用いた。

第3節 1F4 抗体のラットリンパ系細胞との反応性

1F4 mAb のラットリンパ系細胞との反応性を FACS を用いて検討した (Fig. 2-2)。その結果、1F4 mAb は脾臓T細胞および胸腺細胞とは反応するが、骨髄細胞とは反応しないことが明かとなった。また、脾臓由来T細胞上の 1F4 抗原の発現は一様に高密度であった

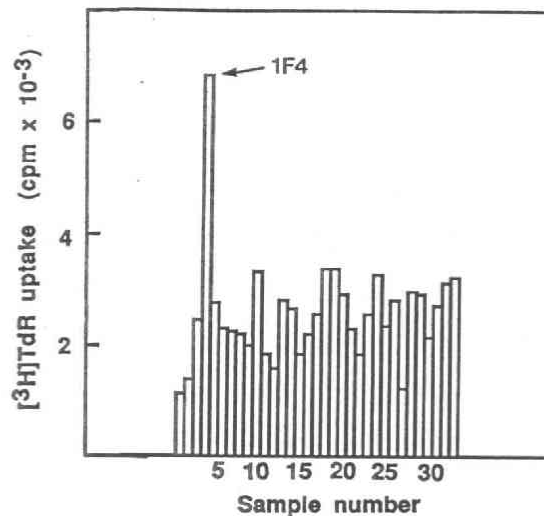


Fig. 2-1. Stimulation of rat spleen cells with culture supernatants of hybridomas in the presence of PMA. Rat spleen cells (5×10^5 cells) were cultured with PMA (20 ng/ml) in the presence of hybridoma culture supernatant (25 %) for 48 hr and were pulsed with [³H]TdR 4 hr before cell harvest.

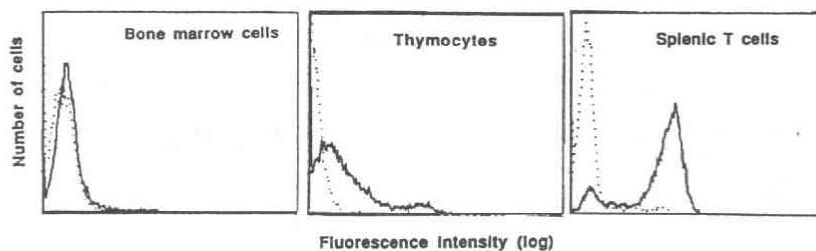


Fig. 2-2. Expression of 1F4 mAb-defined epitope on rat lymphoid cells. Cells were labeled with saturating amount of 1F4 mAb and then stained with R/M FITC. Immunofluorescence was analyzed by means of a FACScan and displayed in logarithmic scale. A left side curve showed the histogram obtained by the staining without mAb (control).

が、胸腺細胞中には約 20 % の高密度に発現している population と約 80 % の発現量の比較的少ない population が認められた。一方、1F4 抗原はマウス T 細胞上には検出されなかった。

次に、1F4 抗原と CD5 (T 細胞 marker) あるいは sIg (B 細胞 marker) の発現を、二重染色後 FACS にて検討した (Fig. 2-3)。その結果、脾細胞において 1F4 抗原の発現は CD5 陽性の T 細胞に認められ、sIg 陽性の B 細胞には検出されなかった。胸腺細胞においては、1F4 抗原の発現が高密度の population には同様に強い CD5 の発現が認められた。また、凍結組織切片を用いた免疫組織学的検索の結果、脾臓における 1F4 抗原の発現は、T 細胞領域である periarterial lymphatic sheath に主として認められ、これは抗 CD5 mAb を用いた結果とよく一致した (Fig. 2-4a)。また、胸腺においては、髄質細胞が皮質細胞よりも強く染色された (Fig. 2-4b)。これらの結果は、1F4 抗原が T 細胞分化過程に関連して発現することを示している。

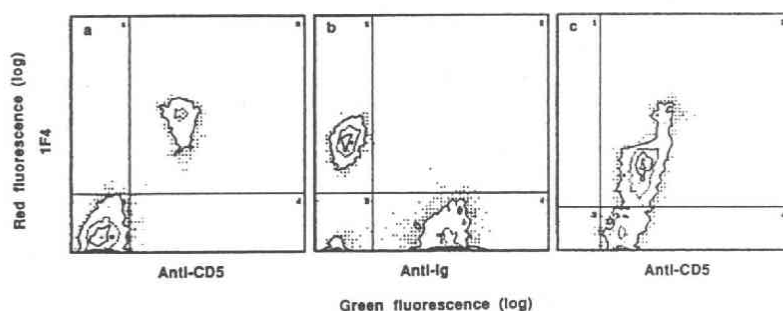


Fig. 2-3. Two-color flow cytometric analysis of spleen cells and thymocytes. Cells were incubated with a mixture of biotinylated 1F4 mAb and FITC-conjugated anti-CD5 or FITC-conjugated rabbit Ig to rat Ig. After washing, the cells were incubated with phycoerythrin-conjugated streptavidin. Immunofluorescence was determined by means of FACScan. (a) and (b) Spleen cells. (c) Thymocytes.

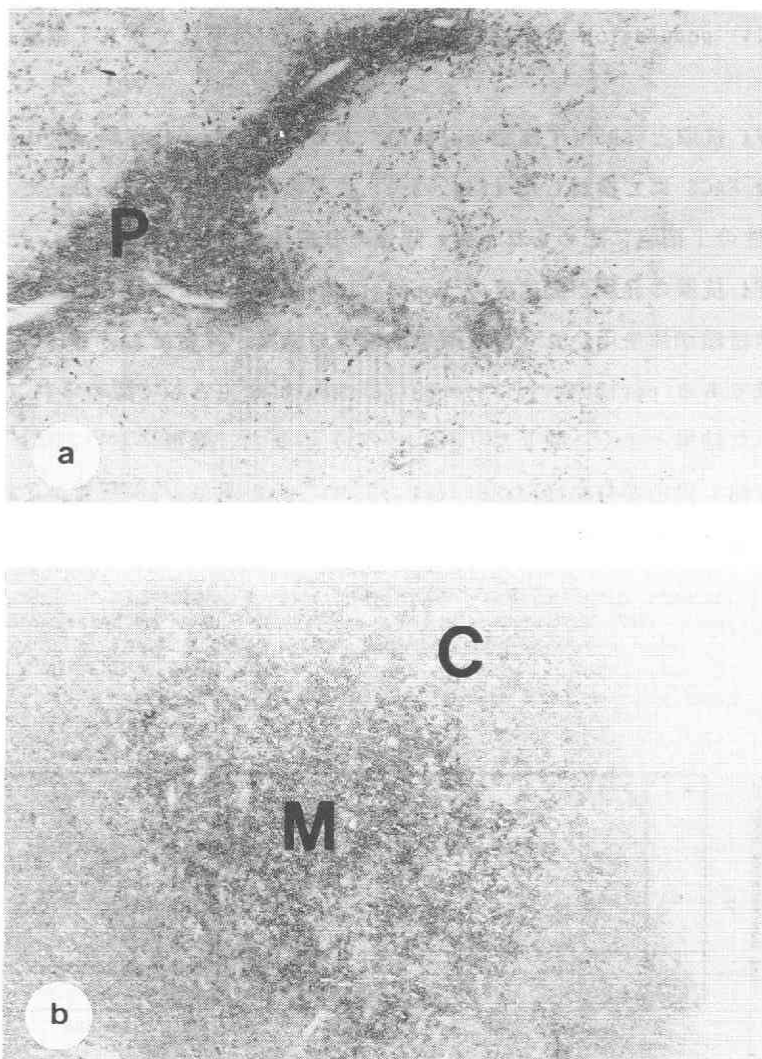


Fig. 2-4. Localization of 1F4 Ag-bearing lymphocytes in spleen and thymus. Cryostat sections were labeled with 1F4 mAb and then stained by avidin-biotinylated peroxidase complex method. (a) Spleen cells. Cells in periaarterial lymphatic sheath (P) were stained. (b) Thymus. The 1F4 mAb stained strongly at medulla (M) and weakly at cortex (C). (Original magnification x 25).

さらに、1F4 抗原の既知のラット T 細胞抗原との異同を明かとするために、1F4 抗原を 1F4 mAb により modulate させた後の細胞を抗ラット CD5 mAb、抗ラット CD2 mAb および MRC OX-52 mAb により染色し FACS を用いて解析した (Fig. 2-5)。その結果、1F4 抗原を modulate させた後も CD5、CD2 および OX-52 抗原の発現は変化しないことから、1F4 抗原は既知のラット T 細胞抗原とは異なった分子であることが示された。

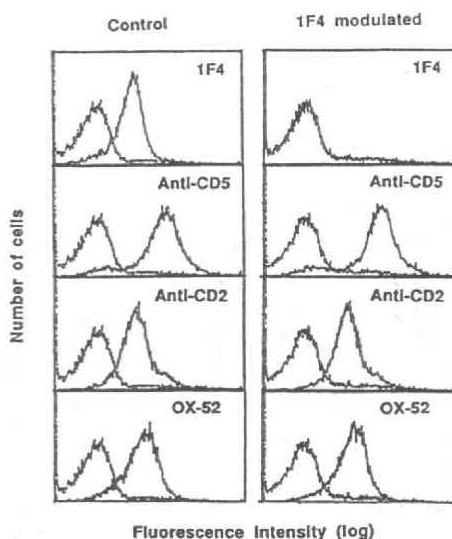


Fig. 2-5. Antigenic modulation with 1F4 mAb. Rat T cells were cultured in the presence or absence of 1F4 mAb (20 μ g/ml) for 24 hr. The cells were labeled with 1F4, R1-3B3 (anti-rat CD5), MRC OX-34 (anti-rat CD2) and MRC OX-52 mAb. Immunofluorescence was measured by means of FACS analyzer. Curves shown in dotted line represent the control histograms obtained by the staining without mAb.

第4節 1F4 抗原の生化学的性状の解析

ラット T 細胞を ^{125}I 標識後、NP-40 にて可溶化し、1F4 mAb 結合 Affigel-10 を用いて免疫沈降した後、SDS-PAGE にて解析した (Fig. 2-6)。その結果、1F4 mAb はラット T 細胞上の分子量約 25,000 の抗原を認識することが示された。また、1F4 抗原分子近傍の構造を明かとするために、ラット T 細胞を ^{125}I 標識後、dithiobis (succinimidyl propionate) (DSP) にて細胞表面分子を化学的に架橋し、同様に免疫沈降し解析した (Fig. 2-6 右)。その結果、DSP による架橋により、1F4 抗原に加えて、分子量 52,000 と 43,000 の二種の分子が共沈することが認められた。

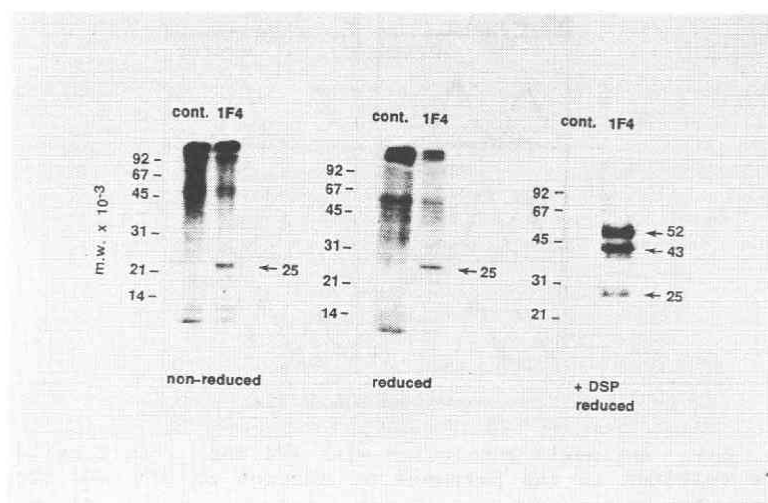


Fig. 2-6. Biochemical analysis of 1F4 mAb defined Ag. Surface radiolabeled rat T cells were treated with or without DSP (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and then extracted with 0.5% NP-40. The pre-cleared extracts were immunoprecipitated with 1F4 mAb conjugated- or irrelevant mAb conjugated-Affigel 10. The immunoprecipitates from the intact cell-extracts were analyzed by SDS-PAGE on a 13% gel under non-reduced or reduced conditions. The immunoprecipitates from cross-linked materials were analyzed by SDS-PAGE on a 10% gel under reduced condition. Position of m.w. markers were shown to the left.

次に、これらを複合体として解析することを目的とし、 ^{125}I 標識 T 細胞を digitonin で可溶化し同様に解析した (Fig. 2-7)。その結果、1F4 抗原と会合する二種のタンパク質が T 細胞上では disulfide 結合した分子量 92,000 の heterodimer を形成していることが示された。

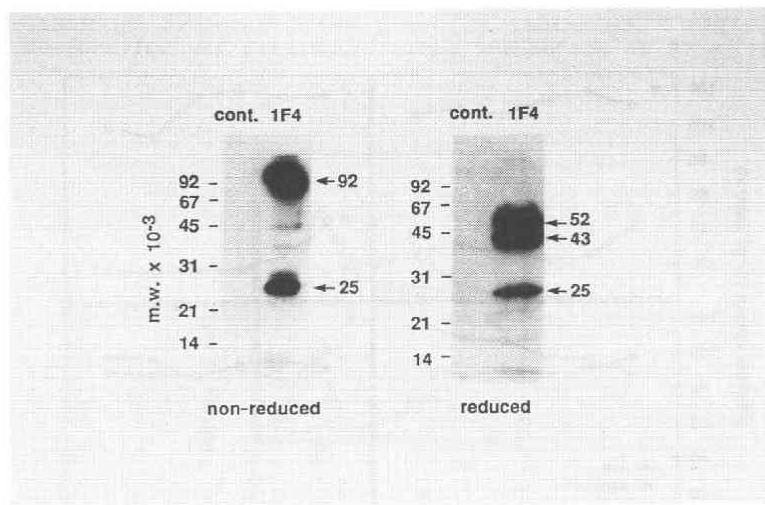


Fig. 2-7. SDS-PAGE analysis of 1F4 mAb-reactive cell surface components from digitonin extracts of rat T cells. Surface radioiodinated rat T cells were extracted with 1% digitonin and were immunoprecipitated with 1F4 mAb conjugated- or irrelevant mAb conjugated-Affigel 10. The antigenic components were analyzed by SDS-PAGE on a 13% gel under non-reduced or reduced conditions. Positions of m.w. markers were shown to the left.

第5節 1F4 抗体によるラットT細胞の活性化の阻害

1F4 mAb のラットT細胞の Con A 反応、allo MLR および IL-2 反応に対する影響を検討した (Fig. 2-8)。その結果、1F4 mAb はラットT細胞の Con A 反応および allo MLR を阻止するが、IL-2 反応 には影響しないことが示された。

そこで 1F4 mAb の Con A 反応抑制機構を精査した。まず、Con A 反応開始後、0、8、24 時間後に 1F4 mAb を添加しその影響を検討した (Fig. 2-9)。その結果、1F4 mAb は Con A 反応開始の初期に存在することがその阻害活性に重要であることが示された。そこで、Con A 反応の初期応答として、1) 活性化抗原 (B3、IL-2R および TrfR) の発現 (Fig. 2-10) および 2) IL-2 産生 (Fig. 2-11) を取り上げ、1F4 mAb の影響を検討した。その結果、1F4 mAb による Con A 反応の阻止は、活性化抗原の発現およびIL-2 産生の抑制によるものであることが示された。

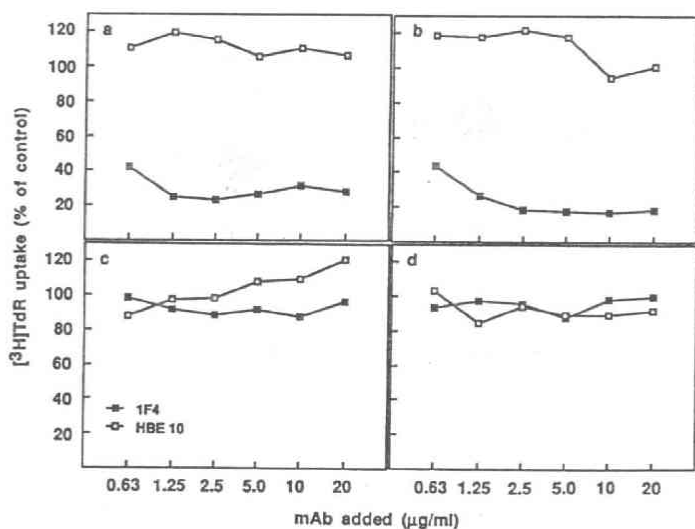


Fig. 2-8. Inhibition of rat T cell proliferation induced by various stimulations with 1F4 mAb. Rat T cells (2.5×10^6 cells/ml) were stimulated with (a) Con A (5 μ g/ml) (b) allogenic spleen cells (2.5×10^6 cells/ml) and (d) IL-2 (1000 U/ml). In (c), rat T cell blasts (5×10^4 cells/ml) induced with Con A was stimulated with IL-2 (50 U/ml). Cells were cultured for 24 hr (c), 48 hr (a) or 72 hr (b) and (d), and then pulsed with [3 H]TdR for 4 hr. mAb were added at the onset of the culture.

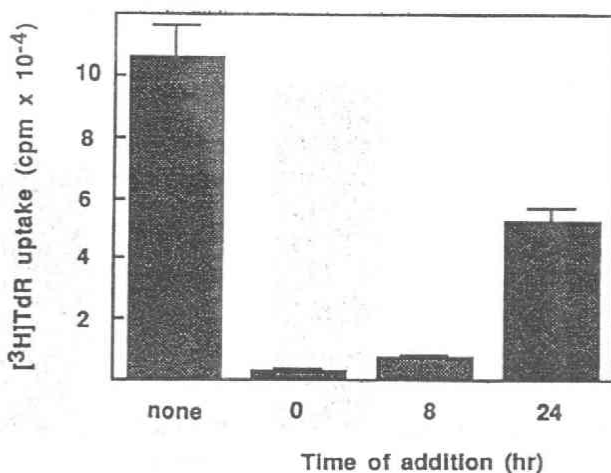


Fig. 2-9. Inhibition of Con A-induced T cell proliferation with 1F4 mAb added at different time point. Rat T cells (2.5×10^6 cells/ml) were stimulated with Con A ($5 \mu\text{g/ml}$), and 1F4 mAb ($20 \mu\text{g/ml}$) was added at the onset of the culture or different time point as indicated. [³H]TdR incorporation was determined after incubation at 37°C for 48 hr.

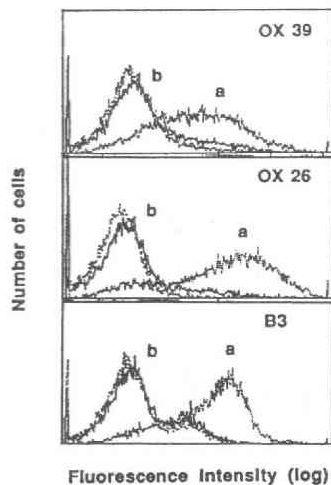


Fig. 2-10. Inhibition of IL-2R, and TrfR and B3 antigen expression with 1F4 mAb on rat T cells in the course of Con A stimulation. Rat T cells cultured in the presence of (a) 1F4 mAb ($20 \mu\text{g/ml}$) or (b) HBE10 ($20 \mu\text{g/ml}$) were stimulated with Con A ($5 \mu\text{g/ml}$) for 48 hr. Cells were labeled with a combination of OX-39 (anti-rat IL-2R) or OX-26 (anti-rat TrfR) and R/M FITC or of biotinylated B3 (anti-rat gp125) and avidin-FITC. Cell surface fluorescence was determined by means of FACS analyzer. The overlapped left side curve was obtained from the cells treated with the second reagent only.

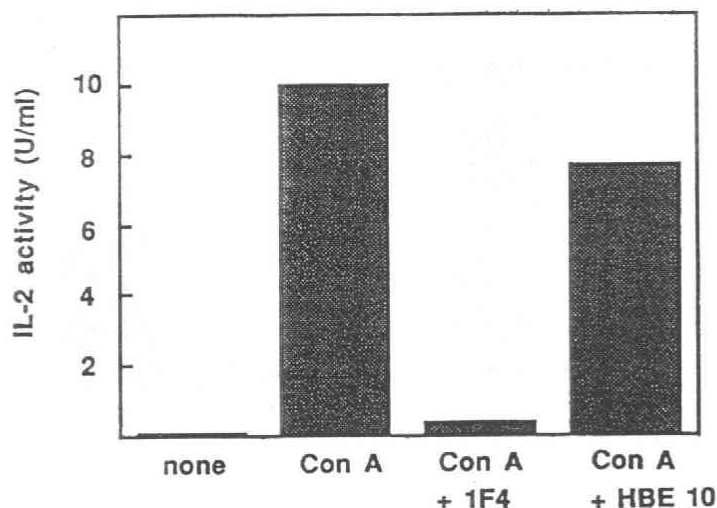


Fig. 2-11. Inhibition of Con A-induced IL-2 production of rat T lymphocytes with 1F4 mAb. Rat T cells (2.5×10^6 cells/ml) were stimulated with Con A (5 μ g/ml) in the presence or absence of mAb (20 μ g/ml). After incubation for 24 hr, cells were spun down and IL-2 activities in the supernatants were determined using CTLL-2 cells as indicator cells.

1F4 抗原が 1F4 mAb により modulate されることはすでに述べたが、この時 1F4 抗原は培養液中から 1F4 mAb を除去することにより細胞表面に再発現する (Fig. 2-12)。そこで次に、1F4 抗原の再発現と allo 抗原に対する T 細胞の反応性の回復の関連を検討した (Fig. 2-13)。その結果、1F4 mAb を培養液から除去することにより、T 細胞は再び allo 抗原に対する反応性を回復することが示された。

第6節 1F4 抗体によるラット T 細胞の増殖誘導

1F4 mAb のラット T 細胞増殖誘導能について検討した (Table 2-1)。その結果、1F4 mAb は mitomycin C (MMC) 処理自己脾細胞の存在下、PMA と共に刺激することにより、ラット T 細胞に顕著な DNA 合成を誘導した。

次に、well に吸着させることにより固相化した 1F4 mAb のラット T 細胞増殖誘導能を検討した (Fig. 2-14)。その結果、固相化した 1F4 mAb は PMA 非存在下にラット T 細胞に強い DNA 合成を誘導することが明かとなった。

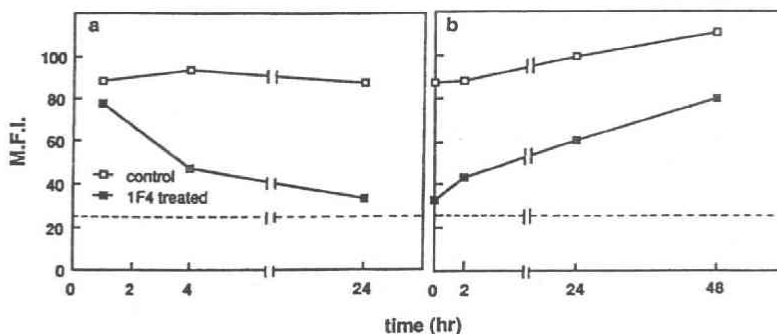


Fig. 2-12. Kinetics of 1F4 antigen modulation and reexpression. (a) Rat T cells (2.5×10^6 cells/ml) were cultured with or without 1F4 mAb (20 μ g/ml) for indicated periods and then 1F4 antigen expression was determined by means of FACScan. (b) Rat T cells cultured with or without 1F4 mAb for 24 hr and then cells were washed three times with culture medium. After incubation for indicated periods, reexpression of 1F4 antigen was determined. In each figure, M.F.I. was calculated by using Consort 30 software equipped to FACScan.

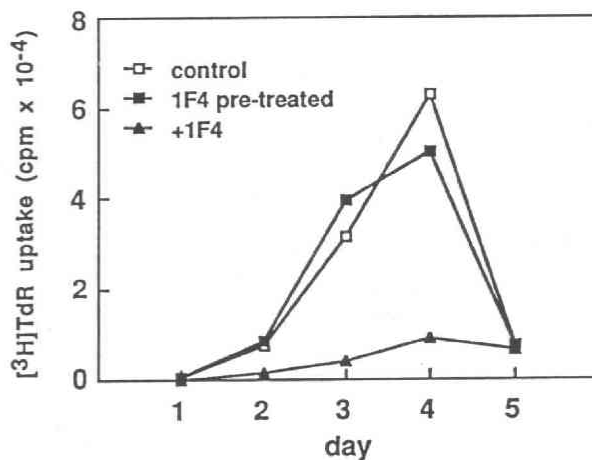


Fig. 2-13. Recovery of responsiveness of rat T cells to allo antigens. F344 rat T cells (2.5×10^6 cells/ml) were cultured with or without 1F4 mAb (20 μ g/ml) for 24 hr, and cells were washed three times with culture medium. Aliquots (2 ml) of the cell suspension (1.2×10^6 cells/ml) were stimulated with equal number of MMC-treated ACI/N rat spleen cells in the presence or absence of 1F4 mAb (20 μ g/ml). $[^3\text{H}]\text{TdR}$ uptake of each culture period was determined by pulsing aliquots (100 μ l) of the cultures in triplicate with 0.5 μ Ci of $[^3\text{H}]\text{TdR}$ for the last 4 hr before cell harvest.

Table 2-1. Induction of T cell proliferation with 1F4 mAb and PMA.

mAb	[³ H]TdR incorporation (cpm ± SD) ¹⁾			
	none	SI ²⁾	+PMA ³⁾	SI ²⁾
none	2964 ± 571	(1.0)	6331 ± 314	(1.0)
1F4 ⁴⁾	3026 ± 24	(1.1)	113783 ± 14905	(18.0)
R1-3B3 ⁵⁾	4708 ± 301	(1.7)	12901 ± 23	(2.0)
HBE 10 ⁴⁾	3618 ± 133	(1.2)	8321 ± 49	(1.3)

Rat T cells (2.5×10^5) were cultured with MMC-treated autologous spleen cells (2.5×10^5) in the presence or absence of various stimuli.

- 1) Cells were cultured in triplicate for 48 hr and were pulsed with [³H]TdR 4 hr before cell harvest.
- 2) SI was calculated as follows; SI = cpm with mAb / cpm without mAb.
- 3) PMA was added at 20 ng/ml.
- 4) Saturating amount of purified mAb was used at 20 µg/ml.
- 5) Saturating amount of ascites containing mAb was used at 1:1000 dilution.

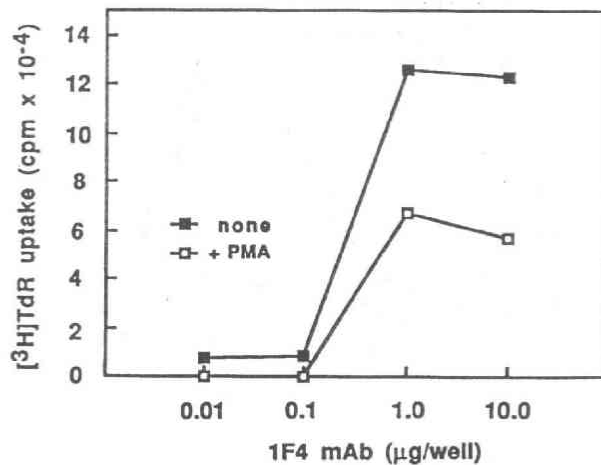


Fig. 2-14. Induction of T cell proliferation with immobilized 1F4 mAb. Rat T cells (5×10^5) were cultured for 48 hr in 1F4 mAb coated 96 well plates in the presence or absence of PMA (20 ng/ml). Stimulated cellular DNA synthesis was assessed by [³H]TdR incorporation in the cells. [³H]TdR incorporation in control cells cultured without stimuli was 4690 ± 539 cpm.

第7節 考 察

1F4 mAb はラット T細胞表面の分子量 25,000 の抗原を認識することが示された。さらに、その近傍には disulfide 結合により分子量 92,000 の heterodimer を形成する分子量 52,000 と 43,000 の二種のタンパク質が同定された。ヒト CD3 抗原は少なくとも、それぞれ、分子量 25,000 および分子量 20,000 の糖タンパク質である γ 鎖、 δ 鎖および分子量 20,000 の糖鎖を持たない ε 鎖から構成され、通常、分子量 43,000 から 49,000 の α 鎖と分子量 38,000 から 44,000 の β 鎖からなる TcR heterodimer (α/β) と非共有結合で複合体を形成している⁽⁵²⁾。また最近 TcR dimer として新たに γ/δ ⁽⁵³⁾ あるいは γ/γ ⁽⁵⁴⁾ が同定されている。また、抗 CD3 mAb および抗 TcR mAb は T細胞に agonistic^(41-45, 47-49) あるいは antagonistic⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾ に作用することが知られている。しかしながら、ラット CD3-TcR 複合体についてはほとんど知られていない。1F4 抗原はその分布、分子構造および T細胞の活性化における機能的な重要性においていままでに報告されているヒトあるいはマウス CD3 ときわめて類似しており、その近傍に同定された heterodimer を形成する二種のタンパク質も、分子量的にヒトあるいはマウス TcR とほぼ一致した。

CD3 抗原は少なくとも三種のタンパク質 γ 、 δ 、 ε 鎖で構成され、これらが非共有結合で会合した複合体であることが知られている⁽⁵⁸⁻⁶¹⁾。今回の免疫沈降の結果でも、分子量 25,000 の 1F4 抗原に加え数種のタンパク質が検出されたが、各 component の関連は不明である。また、1F4 mAb は T細胞に対し agonistic あるいは antagonistic に作用したがその際、T細胞に誘導されるシグナルの生化学的解析の必要がある。これらについては、現在検討中である。

1F4 抗原はラット T細胞のシグナル伝達に重要なばかりでなく、その発現は T細胞の分化過程に密接に関連するものと考えられる。CD3-TcR 複合体についてはヒトおよびマウスの系でかなりの知見が蓄積されているがラットの系における相同性を確認するとともに新たな生物学的重要性の解明のための貴重な marker となるものと考えられる。

第4章 細胞増殖関連抗原に対するモノクローナル抗体の癌化学療法への応用

第1節 序論

腫瘍細胞に対する mAb は、対応抗原の生化学的解析のみならず、癌の診断・治療への応用が試みられている。とりわけ、mAb を用いた抗原特異的な制癌剤あるいは毒素の腫瘍細胞への targeting は、その作用の増強および副作用の軽減が期待されている。現在までに、mAb をリガンドとした薬物・毒素の targeting については数多くの手法が開発されているが、なかでも制癌剤封入抗体修飾リポソーム (chemoimmunoliposomes: CIL) は封入する薬物の選択が可能で汎用性が高い⁽⁶²⁻⁶⁵⁾。

しかしながら、癌治療に有効な CIL 作製に適した mAb の選択基準は明かでない。本章では、細胞増殖関連抗原 (gp125)^(1, 5) に対する mAb を用いた CIL の in vitro における抗腫瘍効果を検討するとともにその細胞傷害活性と、用いた抗 gp125 mAb の標的細胞上の抗体結合部位数 (以下、抗原量) および標的細胞との親和性との関連について考察する。

第2節 細胞増殖関連抗原に対する CIL の作製

まず最初に、N-hydroxysuccinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP) による抗体 SH 化の至適条件について、B3 mAb (抗ラット gp125) をを用いて検討した。その結果、SPDP 濃度の上昇に伴い抗体に導入される SH 基数は増加することが示された (Fig. 3-1)。しかしながら、抗体に対しモル比 20 倍以上の SPDP を用いると B3 mAb の標的細胞への結合能が低下することが示された (Fig. 3-2)。また 40 倍量の SPDP により抗体の沈殿が生じた。そこで抗体に対し、モル比 5 倍の SPDP を用い 1 分子あたり約 2.3 個の SH 基を導入した抗体を用い、抗体修飾リポソーム (immunoliposomes: IL) を作製した結果、脂質 1 μmol あたり 60 μg の conjugation が認められ、mAb の回収率は約 80 % と良好であった。次に作製した IL に Na^+/K^+ イオン勾配を用いて^(66, 67) adriamycin を封入し、CIL を作製した結果、脂質 1 μmol あたり 15 μg の adriamycin の封入が認められ回収率は約 75 % と良好であった。また、この結果をもとに HBJ127 mAb (抗ヒト

gp125) についても同様の操作で CIL を作製した。

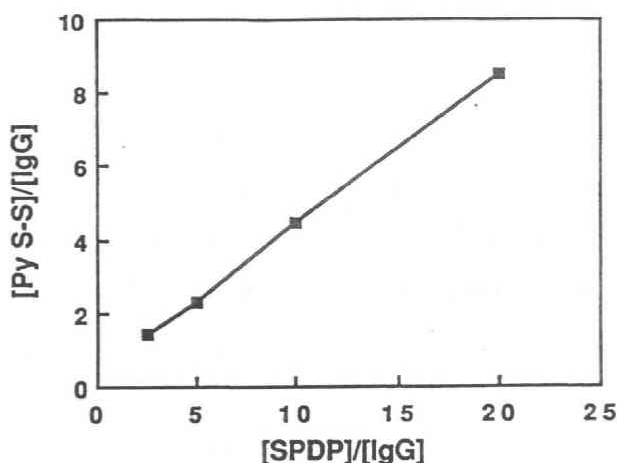


Fig. 3-1. Introduction of 2-pyridyl disulphide groups into B3 mAb with SPDP. B3 mAb in 0.1 M sodium phosphate buffer containing 0.1 M NaCl pH 7.5 was treated with various amounts of SPDP for 30 min at 23 C° and then dialysed against 0.1 M sodium acetate buffer containing 0.1 M NaCl pH 4.5. The numbers of 2-pyridyl disulphide structure introduced were calculated from the amount of pyridyl-2-thione (molar absorptivity 8.08×10^3 at 343 nm) released on treatment of the modified B3 mAb with dithiothreitol.

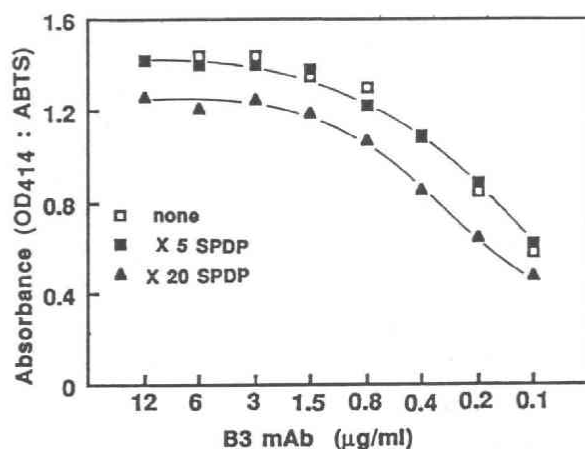


Fig. 3-2. Reactivity of thiolated B3 mAb. B3 mAb was thiolated with various amounts of SPDP followed by dithiothreitol reduction. Reactivities of modified or unmodified B3 mAb were determined by means of ELISA by using formalin fixed BC47 cells as targets.

第3節 In vitro における IL および CIL の標的細胞に対する結合能の検討

^{14}C 標識 IL を等分し、一方は IL とし、他方は adriamycin 封入後 CIL として標的細胞に対する結合能を検討した (Fig. 3-3)。その結果、作製した IL および CIL はともに抗原特異的にヒトおよびラット由来の膀胱癌および T lymphoma に結合することが示された。また CIL の標的細胞に対する結合量は IL の結合量に比して若干低値を示した。非特異的結合はシステインを修飾したリボソームと変わらなかった。また、HBJ127-IL および HBJ127-CIL の結合量はヒト T lymphoma Molt-4 に比しヒト膀胱癌 T24 が高値を示した。同様に B3-IL および B3-CIL の結合量はラット T lymphoma FTL-13 に比しラット膀胱癌 BC47 が高値を示した。

次に、CIL 結合の抗原特異性を過剰量の遊離抗体を用いた competitive binding inhibition assay にて検討した (Fig. 3-4)。その結果、B3-CIL の BC47 に対する結合は、HBJ127 mAb では影響をうけないが B3 mAb により阻止されることが示された。一方、同様に HBJ127-CIL の T24 に対する結合は HBJ127 mAb によってのみ阻害された。これらの結果は、CIL と標的細胞の結合は特異的な抗原抗体反応によるものであることを示している。

第4節 標的細胞に対する抗 gp125 抗体結合の Scatchard plot analysis

前述したように、抗 gp125 CIL はヒトおよびラットのいずれの系においても T lymphoma に比し、膀胱癌に対して高い結合性を示した。この差異には標的細胞上の抗原量あるいは抗体の標的細胞に対する親和性が関与すると考えられる。そこで、これらと CIL の標的細胞に対する結合性との関連を明かとするために ^{125}I 標識抗 gp125 mAb を用いた Scatchard plot analysis を行った (Fig. 3-5)。その結果、ラットの系における B3 抗原量は BC47 で 3.4×10^5 sites/cell、FTL-13 で 1.1×10^5 sites/cell と膀胱癌がより高値を示した。一方、B3 mAb のこれらの細胞に対する親和性はほぼ同等であった ($K_a = 1.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$)。またヒトの系において HBJ127 抗原量は T24 において 8.4×10^5 sites/cell、Molt-4 において 4.4×10^5 sites/cell と同様に膀胱癌が高値を示した。また、HBJ127 mAb のこれらの細胞に対する親和性はほぼ同等であった ($K_a = 0.29 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$)。

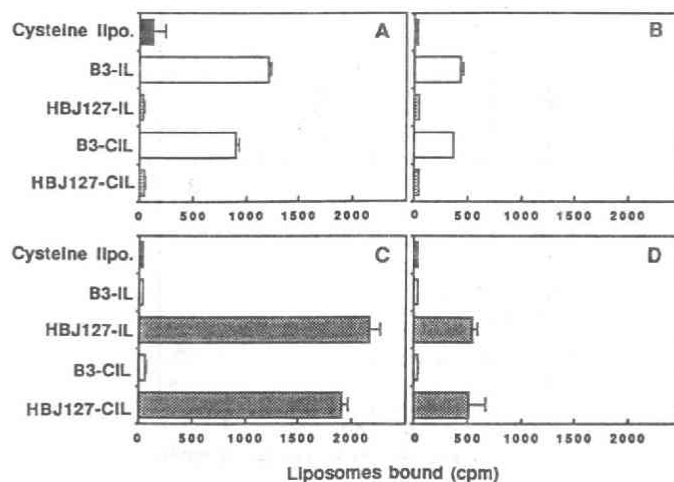


Fig. 3-3 Binding ability of IL, CIL and cysteine-coated liposomes (cysteine lipo.). ^{14}C -labeled liposomes (IL or CIL modified with the indicated mAb) were added to 200 μl of target tumor cell suspension containing 5×10^5 cells at a final concentration of 300 μM lipid. After incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min, the cells were washed and cell-associated radioactivity was determined. Target cells: A, BC47; B, FTL-13; C, T24; D, Molt-4.

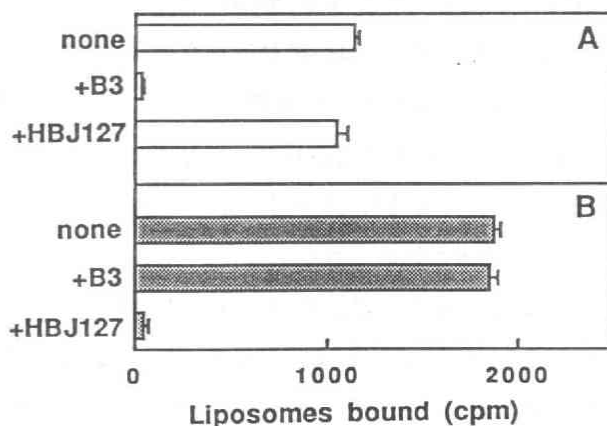


Fig. 3-4 Competitive inhibition of CIL-target cell binding with mAb. CIL and target cells were incubated for 30 min in the presence or absence of B3 or HBJ127 mAb. After a washing, the radioactivity bound to the cells was determined. A, B3-CIL and BC47 rat bladder cancer cells; B, HBJ127-CIL and T24 human bladder cancer cells.

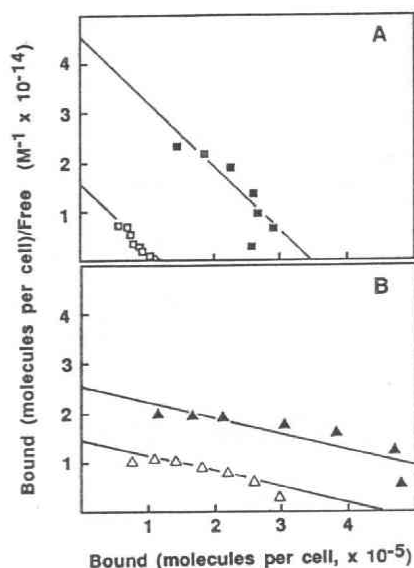


Fig. 3-5 Scatchard plot analysis of anti-gp125 mAb binding. ^{125}I -labeled mAb was added to 200 μl of tumor cell suspension containing 3×10^5 cells. After incubation for 60 min at 4°C , the cells were washed and then radioactivity bound to the cells was counted. A: \blacksquare , B3 mAb bound with BC47 cells; \square , B3 mAb bound with FTL-13 cells. B: \blacktriangle , HBJ127 mAb bound with T24 cells; \triangle , HBJ127 mAb bound with Molt-4 cells.

第5節 in vitro における抗 gp125 CIL の標的細胞傷害性

腫瘍細胞と遊離 adriamycin、B3-CIL および HBJ127-CIL を 30 分反応後洗浄し、24 時間培養後の $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 取り込みを指標に、CIL の標的細胞傷害性を検討した (Fig. 3-6)。その結果、ヒトおよびラットの系において CIL は膀胱癌に対しては抗原特異的な細胞傷害性を示したが T lymphoma に対する作用は弱かった。またこの条件において遊離 adriamycin の IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$) は BC47 ; 0.27、FTL-13 ; 0.26、T24 ; 0.42、Molt-4 ; 0.54 であった。一方 mAb 単独では効果は認められなかった。

次に標的細胞を過剰量の mAb 存在下、CIL と 30 分反応後洗浄し、4 日間培養後の生細胞数を trypan blue dye exclusion test により計数し CIL の細胞傷害活性の抗原特異性を検討した (Fig. 3-7)。その結果、B3-CIL の BC47 に対する細胞傷害活性は、HBJ127 mAb によっては影響を受けなかったが、B3 mAb により阻害されることが示された。一方、HBJ127-CIL の T24 に対する細胞傷害活性は HBJ127 mAb によってのみ阻害されることが示された。これらの結果は、CIL の細胞傷害性は CIL と標的細胞との抗原抗体反応を介した結合によるものであることを示している。

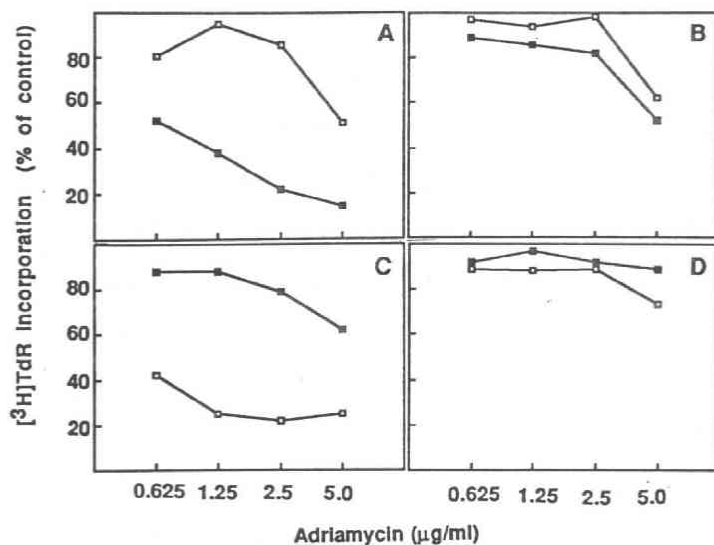


Fig. 3-6 *In vitro* cytotoxicity of CIL. Target tumor cells were incubated with CIL for 30 min at 37 °C. After a washing, the cells were further incubated for 24 hr and then $[^3\text{H}]\text{TdR}$ incorporation was determined. These CIL containing 15 μg of adriamycin per 1 μmol of lipid. ■, B3-CIL; □, HBJ127-CIL. Target cells: A, BC47; B, FTL-13; C, T24; D, Molt-4.

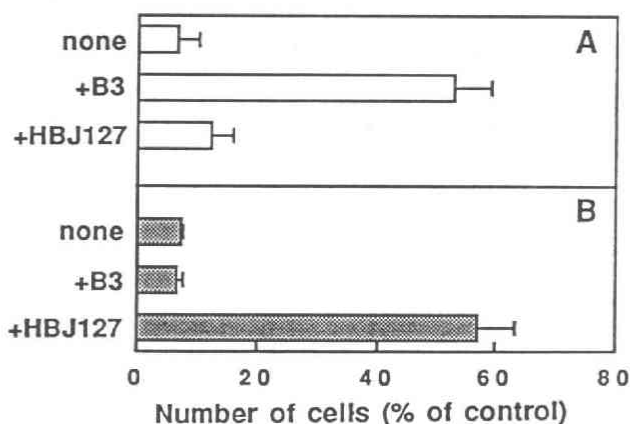


Fig. 3-7 Competitive inhibition of cytotoxicity of CIL with mAb. CIL and target tumor cells were incubated for 30 min in the presence or absence of B3 or HBJ127 mAb. After a washing, the tumor cells were further cultured for 4 days, and viable cells were counted by means of trypan blue dye exclusion test. A, B3-CIL and BC47 rat bladder cancer cells; B, HBJ127-CIL and T24 human bladder cancer cells.

第6節 考 察

Na^+/K^+ イオン勾配を用いて adriamycin を封入した B3-CIL および HBJ127-CIL はそれぞれ対応する膀胱癌および T lymphoma に対し、抗原特異的に結合し、その結合量はいずれの場合においても膀胱癌が T lymphoma に比べて高値を示した。この差異は ^{125}I 標識抗 gp125 mAb を用いた Scatchard plot analysis の結果、標的細胞上の gp125 抗原量に依存しており、標的細胞に対する抗体の親和性の関与はこの系では認められなかった。

これらの CIL の in vitro における標的細胞傷害性を検討した結果、B3-CIL および HBJ127-CIL はともに対応する膀胱癌に対して抗原特異的な細胞傷害性を示したが、T lymphoma に対する作用は弱かった。これは上述の抗原特異的な CIL の結合量の差異によるものと考えられた。

CIL の細胞傷害活性発現に関与する因子として 1) リボソームの安定性 2) 標的細胞に対する結合能 3) 標的細胞へ結合後の CIL からの薬物の放出速度 4) 結合した CIL を標的細胞が endocytosis する割合等が考えられる。CIL や immunotoxin が効果的に作用を発現するためには、一般に、結合後の標的細胞内への internalization が重要であると考えられている^(63, 64, 68, 69)。しかしながら、一方、巧妙に選択された脂質組成からなる CIL は標的細胞に結合後速やかにその内容物を放出することも知られている⁽⁷⁰⁾。今回用いた CIL は薬物保持の観点からは比較的安定であると考えられ、抗 gp125-CIL の細胞傷害活性の作用機構および膀胱癌と T lymphoma に対する細胞傷害活性の差異の原因を明かとするためには標的細胞側の endocytosis 効果等の検討が必要であると考えられる。

本研究において gp125 抗原系は膀胱癌に対する CIL の標的抗原となりうることが示された。抗 gp125-CIL の in vivo における抗腫瘍効果は今後の研究課題であるが、gp125 抗原は膀胱癌において癌部にのみ強く発現していることから、少なくとも膀胱癌の局所治療への適用は有望であると考えられる。

第五章 総 括

1975 年 Köhler と Milstein により確立された mAb 作製技術は医学、生物学分野に導入され、特に、細胞の分化・増殖に重要な役割を果たす細胞膜上の機能分子の同定・解析に威力を発揮している。本研究において細胞増殖関連抗原 (gp125) に対する mAb を用いた解析より

- 1) gp125 抗原のリンパ球上への発現には protein kinase C の活性化およびカルシウムイオンの動員の両者が必要である
- 2) 細胞内 c-AMP 濃度の上昇は gp125 発現に対して抑制的に作用するが c-GMP は影響を示さない
- 3) リンパ球活性化の初期過程において gp125 の発現は TrfR の発現に先行するが、分裂後のリンパ球では TrfR の速やかな消失に対し、gp125 (B3 抗原) は比較的長期間残存する

が明かとされた。

また、今回、ラット T 細胞活性化に関連する抗原を認識する 1F4 mAb が新たに作製され、

- 1) 1F4 mAb はラット T 細胞上の分子量 25,000 の抗原を認識する
- 2) 1F4 抗原は T 細胞上で分子量 43,000 と 52,000 のサブユニットからなる heterodimer と会合している
- 3) 1F4 mAb は T 細胞の Con A 反応および MLR を阻害する
- 4) 1F4 mAb は MMC 処理自己脾細胞と PMA の存在下、T 細胞に顕著な DNA 合成を誘導する
- 5) 固相化 1F4 mAb は PMA 非存在下でも T 細胞に強い増殖を誘導する

が明かとされた。これらの結果から 1F4 抗原はラット CD3 のいずれかのサブユニットであると推定され、T 細胞の分化・増殖機構解析の有用な marker となると期待される。

現在、mAb は既にその優れた特異性および均一性から癌の診断、治療分野への応用が試みられているが、今回作製した抗 gp125 CIL について

- 1) B3-CIL および HBJ127-CIL は各々対応する膀胱癌に対して抗原特異的な増殖抑制作用を示したが T lymphoma に対する作用は弱い
- 2) Scatchard plot analysis の結果、標的細胞上の抗原量が CIL の作用発現に関与する

が明かとされ、gp125 抗原は膀胱癌において癌部にのみその発現が強く認められることより、少なくとも膀胱癌局所への適用の可能性が示された。

以上のごとく mAb の医学・生物学の分野における重要性は益々大きいものとなっている。近年の遺伝子工学的手法を取入れたタンパク質工学の進展に伴い、現在では任意の特異性を有する抗体のデザインなども試みられており、mAb は基礎研究のみならず、感染症、自己免疫疾患、あるいは癌などに対する強力な武器となるものと考えられる。

第6章 実験材料および方法

第1節 第2章付属実験

1-1 動物

雄性 SD ラット（静岡県実験動物農業協同組合）を 6 - 10 週令で使用した。

1-2 培地

RPMI 1640（日水製薬）に、1% 炭酸水素ナトリウム、10 mM HEPES、1 μ M ピルビン酸ナトリウム、2 mM L- グルタミン、100 U/ml ペニシリン、60 μ g/ml カナマイシン、50 μ M 2-ME および 10% FCS を添加し用いた。また MEM 培地（日水製薬）に同様な添加物を加えて用いた。

1-3 mAb

MRC OX-26 mAb⁽⁷¹⁾ (IgG_{2b} ; 抗ラット TrfR) および MRC OX-39 mAb⁽⁷²⁾ (IgG1 ; 抗ラット IL-2R) は Sera-lab より購入した。抗 Tac mAb⁽⁷³⁾ (IgG2a ; 抗ヒト IL-2R) は 京都大学医学部第一内科 内山博士より恵与された。FITC 標識抗ヒト TrfR mAb (IgG2a) は Becton Dickinson 社より購入した。B3 mAb (IgG1 ; 抗ラット gp125) および HBJ127 mAb (IgG1 ; 抗ヒト gp125) はハイブリドーマ移植マウス腹水より、硫酸塩析後、DEAE カラムクロマトグラフィーにより精製した。また biotin 化は N-hydroxysuccinimidyl biotin (Pierce) を用いて行った。

1-4 試薬

PMA (Sigma)、A23187 (Calbiochem)、forskolin (日本化薬株式会社より恵与)、dbc-AMP (Sigma)、dbc-GMP (Sigma)、Con A (Sigma)、R/M FITC (Dako-patts)、avidin-FITC (Vector Laboratories) を使用した。

1-5 培養細胞

ヒト T 細胞白血病株 Molt-4F (東北大学抗酸菌病研究所、橋博士より恵与) および Jurkat は RPMI 1640 培地にて継代維持した。Donryu ラット肝癌細胞 AH-13 およびヒト膀胱癌細胞 MGH-U1 は MEM 培地にて継代維持した。

1-6 ラット脾臓 T 細胞の調整

脾臓を動物から無菌的に取り出し、培地中ピンセットでしごき、浮遊細胞とする。遠心洗浄後、混在する赤血球を 0.83% NH₄Cl (Tris-HCl 緩衝液) にて除去する。遠心洗浄後、

予め 5 % FCS 加 RPMI 1640 培地で洗浄し 37 °C に保温してあるナイロンウールカラム上端から脾細胞を流入させて 37 °C、45 分 incubate する。続いて 37 °C の 5 % FCS 加 RPMI 1640 培地にてナイロンウール非付着性の細胞を回収し、脾臓 T 細胞として実験に用いた⁽⁷⁴⁾。

1-7 ヒト末梢血リンパ球の調整

健康人末梢血を無菌的にヘパリン採血し、等量の PBS で希釈する。これを等量の Lymphoprep (Nycomed、比重 1.077) に重層し室温で 3000 rpm、30 分遠心し、末梢単核球を得る。RPMI 培地にて洗浄後、plastic dish 付着性細胞を除去し、リンパ球画分として実験に用いた。

1-8 リンパ球増殖反応

ラット T 細胞浮遊液 (2.5×10^6 cells/ml) 0.2 ml を 96 穴プレートに分注し、種々の条件で刺激剤を加えて 48 時間培養する。リンパ球の増殖応答は、培養終了 4 時間前に [³H]TdR (0.5 μ Ci/well) を加えその取り込みを指標に算定した。

1-9 細胞表面抗原の解析

1×10^6 個の細胞を飽和量 (約 1 μ g) の未標識 mAb あるいは biotin 化 mAb と 4 °C、45 分反応後 PBS で洗浄し、未標識 mAb は R/M FITC を用いて、biotin 化 mAb は avidin-FITC を用いてそれぞれ 4 °C、45 分染色した。細胞を洗浄後、1 % paraformaldehyde にて固定し、FACS analyzer を用いて 10^4 個の細胞を解析した。

1-10 活性化 T 細胞の静止期への再誘導

ラット脾臓 T 細胞 (2.5×10^5 cells/ml) を Con A (5 μ g/ml) で 48 時間刺激後、0.1 M α -methylmannoside (α -MM) で細胞を洗浄し、細胞濃度を 2×10^6 cells/ml とした後に、刺激剤を用いることなく再び培養し、経時的に IL-2 あるいは Con A に対する反応性または細胞表面の抗原発現を解析した。

第2節 第3章付属実験

2-1 動物

雄性 F344 ラット、雄性 ACI/N ラットおよび雄性 Balb/c マウス (いずれも静岡県実験動物農業協同組合より購入) を 6 - 10 週令で使用した。

2-2 ラット CD3 様抗原に対する mAb の作製

PMA (20 ng/ml) + A23187 (0.3 μ M) で 6 時間刺激しさらに 18 時間培養した F344 ラット脾臓 T 細胞で Balb/c マウスを免疫し、polyethyleneglycol 法により Balb/c マウス由来ミエローマ X63Ag8.653 と融合し、抗体産生ハイブリドーマを得た。HAT 選択後、ハイブリドーマ培養上清中の抗体を 1) F344 ラット T 細胞と反応すること および 2) ラット膀胱癌細胞 BC47⁽⁷⁵⁾ とは反応しないこと を基準とし選別を行った後、F344 ラット脾臓細胞に対する PMA (20 ng/ml) との co-stimulation assay にて 1F4 抗体産生ハイブリドーマを選択し limiting dilution 法により clone 化した。1F4 mAb (IgM - κ) は、ハイブリドーマ移植マウス腹水より 50 % 飽和硫酸塩析、Sephacryl S-300 gel 濾過により精製し、以下の実験に用いた。

2-3 他の mAb および標識二次抗体

MRC OX-34 mAb⁽⁷⁶⁾ (IgG_{2a} ; 抗ラット CD2) および MRC OX-52 mAb⁽⁷⁷⁾ (IgG_{2a} ; 抗ラット T 細胞) は Sero-tec 社より購入した。R1-3B3 mAb⁽⁷⁸⁾ (IgG_{2a} ; 抗ラット CD5) は札幌医大第一病理より恵与された。HBE 10 mAb⁽⁷⁹⁾ (IgM ; 抗ヒト膀胱癌細胞 KU-1) および 236 (IgM ; 抗マウスメラノーマ細胞 ; 札幌医大第一病理より恵与) はラットリンパ球に対する negative control として用いた。R/M FITC および R/R FITC は Dakopatts 社より購入した。

2-4 フローサイトメトリー

1) シングルパラメーター解析

細胞を飽和量 (約 1 μ g) の抗体と 4 °C、45 分反応後 PBS で洗浄し R/M-FITC で染色後 FACS analyzer または FACScan を用いて解析した。

2) 2 パラメーター解析

細胞 (1×10^6) を FITC 標識抗体および biotin 化 1F4 mAb と反応後 PBS で洗浄し、phycoerythrin (PE) conjugated streptavidin (Becton Dickinson Immunocytometry System) で染色後 FACScan を用いて解析した。

2-5 Immunoperoxidase 染色

F344 ラット脾臓および胸腺の凍結切片を冷 acetone にて 5 分間固定後、1F4 mAb と反応させ、avidin-biotinylated peroxidase complex kit (Vector Laboratories) を用いて染色した。

2-6 Antigenic modulation の解析

F344 ラット脾臓 T 細胞浮遊液 (2.5×10^6 cells/ml) 2 ml を 1F4 mAb (20 μ g/ml) の

存在下あるいは非存在下 24 時間培養する。PBS で洗浄後、細胞を 1F4、R1-3B3、OX-34 あるいは OX-52 と反応後、R/M FITC で染色し FACS analyzer を用いて解析した。

2-7 Immunoprecipitation による 1F4 抗原の生化学的解析

1) NP-40 extract からの immunoprecipitation

F344 ラット脾臓 T 細胞 (1×10^8) を 20 mM glucose を含む PBS 1 ml に浮遊させ、 Na^{125}I (1 mCi) を lactoperoxidase-glucose oxidase 法により標識した。細胞表面抗原の化学架橋は、DSP (100 $\mu\text{g/ml}$) (Pierce Chemical Co.) を加え、室温で 30 分行い⁽⁸⁰⁾、Tris-buffered saline (TBS) で洗浄し反応を終了させた⁽⁸¹⁾。 ^{125}I 標識 T 細胞を 0.5 % NP-40 および 1 mM PMSF を含む TBS で可溶化し、normal mouse Ig 結合 Affigel-10 (Bio-Rad) にて preclear 後、1F4 mAb あるいは 3C6 mAb (negative control) を結合した Affigel-10 を用いて免疫沈降を行った。抗体結合 Affigel は 0.5 % NP-40、0.5 % deoxycholate、0.04 M EDTA、10 mM KI、0.05 % NaN_3 を含む TBS で洗浄後、抗原を SDS-PAGE sample buffer で溶出し SDS-PAGE の後 autoradiography を行い対応抗原を決定した。

2) digitonin extract からの immunoprecipitation

同様に ^{125}I 標識した F344 ラット T 細胞を 1 % digitonin (和光)、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を含む TBS で可溶化し、同様に抗体結合 Affigel-10 を用いて、免疫沈降を行う。抗体結合 Affigel は 1 % digitonin、1 mM PMSF を含む TBS で洗浄し、同様に解析した。

2-8 1F4 mAb によるラット T 細胞の活性化阻害

F344 ラット脾臓 T 細胞 (2.5×10^5 cells/ml) の Con A 反応 (5 $\mu\text{g/ml}$) および同数の ACI/N ラット脾細胞に対する MLR の培養系に 1F4 mAb (20 $\mu\text{g/ml}$) を加え、各々 48 時間および 72 時間培養後の ^3H TdR 取り込みに及ぼす影響を検討した。IL-2 産生は CTLL-2 を指示細胞として測定した。また 1F4 mAb で 24 時間前処理した細胞を PBS で洗浄し allo 抗原 (ACI/N ラット脾細胞) に対する反応性の回復を検討した。

2-9 1F4 mAb によるラット T 細胞の増殖誘導

F344 ラット脾臓 T 細胞 (2.5×10^5) と MMC 処理自己脾細胞 (2.5×10^5) を 200 μl の培養液中、PMA (20 ng/ml) 存在下あるいは非存在下に種々の抗体で刺激し、48 時間培養後の ^3H TdR 取り込みを測定した。

2-10 固相化 1F4 mAb によるラット T 細胞の増殖誘導

1F4 mAb の固相化は 96 well plastic plate に種々の濃度の 1F4 mAb (PBS 溶液) を加え 37 °C で 3 時間 incubate することにより行った。ここに F344 ラット脾臓 T 細胞 (2.5×10^5) を加え、PMA (20 ng/ml) 存在下あるいは非存在下に 48 時間培養後の [^3H]TdR 取り込みを測定した。

第3節 第4章付属実験

3-1 試薬

Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)、dipalmitoylphosphatidylethanolamine (DPPE)、cholesterol および valinomycin はシグマ社より購入した。Iodogen および m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester (MBS) は Pierce 社より購入した。SPDP はフェルマシア社より購入した。 [^3H]TdR、Cholesteryl[1- ^{14}C]oleate および Na ^{125}I はアマシャム社より購入した。Adriamycin は協和発酵工業より供与された。

3-2 培養細胞

Nitrosamine 誘発 ACI/N ラット膀胱癌 BC47 およびヒト膀胱癌 T24 は 10 % FCS 加 DMEM 培地にて継代維持した。Propylnitrosourea 誘発 F344 ラット胸腺腫 FTL-13⁽⁸²⁾ およびヒト T 細胞白血病株 Molt-4 は 10 % FCS 加 RPMI 1640 培地にて継代維持した。

3-3 mAb

B3 mAb (IgG₁ ; 抗ラット gp125) および HBJ127 mAb (IgG₁ ; 抗ヒト gp125) はそれぞれハイブリドーマ移植マウス腹水から 50 % 飽和硫酸塩析、DEAE カラムクロマトグラフィーにより精製し使用した。

3-4 SPDP を用いた mAb への SH 基の導入³³⁾

予め 0.1 M NaCl を含む 0.1 M リン酸緩衝液、pH 7.5 に透析した mAb (5 mg/ml) 2 ml に、15.6 mM SPDP エタノール溶液 20 μl を加え穏やかに攪はんしながら 23 °C 30 分反応した後、0.1 M NaCl を含む 0.1 M 酢酸緩衝液、pH 4.5 で平衡化した Sephadex G25 カラムを用い抗体と過剰の試薬を分離する。次に抗体溶液に dithiothreitol (50 mM) を加え 23 °C 30 分還元した後、169 mM グルタミン酸を含む HEPES 緩衝液、pH 6.8 (K⁺緩衝液) で平衡化した Sephadex G25 カラムを用い SH 化抗体と過剰の試薬を分離した。SH 基を導入した B3 mAb の活性は BC47 を標的細胞とした ELISA で決定した。

3-5 抗体修飾リボソームの作製

橋本らの方法^(62, 84)に準じて抗体修飾リボソームを作製した。即ち、DPPC 25 μmol 、cholesterol 17.5 μmol および N-(m-maleimidobenzoyl)dipalmitoylphosphatidylethanolamine (MBPE) 2.5 μmol のクロロホルム溶液からクロロホルムを留去することにより均一な lipid film を作製後、 K^+ 緩衝液 5 ml を加え、激しく震とうすることにより multilamellar vesicles (MLV) を作製する。これを超音波処理することにより SUV を作製後、凝集したリボソームを 10000 x g、10 分の遠心操作により除去し 4 ml の small unilamellar vesicles (SUV) 画分を得る。これに SH 化抗体 (1 mg/ml) 2 ml を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間反応後、cysteine 5 mg を加え SUV 上の過剰の maleimido 基を block した後、150 mM の NaCl を含む HEPES 緩衝液、pH 7.5 (Na^+ 緩衝液) で平衡化した Sepharose CL-4B カラムを用い、抗体修飾リボソームと未結合の抗体を分離し、同時に K^+ をリボソーム内、 Na^+ をリボソーム外とするイオン勾配を作製した。 ^{14}C 標識リボソームは、cholesteryl[1- ^{14}C]oleate を脂質混合液中に加え、同様に作製した。リボソームに含まれる脂質および抗体量は、橋本らの方法^(62, 84)により決定した。

3-6 IL への adriamycin の封入^(66, 67)

予めイオン勾配を作製した IL に adriamycin (20 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ lipid) と valinomycin (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ lipid) を加え 37 $^{\circ}\text{C}$ 、4 時間 incubate し adriamycin を封入した後、 Na^+ 緩衝液で平衡化した Sepharose CL-4B カラムを用い、CIL と未封入の adriamycin を分離する。CIL は polycarbonate filter (pore size ; 0.4 μm) を用いて濾過滅菌し、実験に用いた。また adriamycin 濃度は 0.5 % Triton X-100 でリボソームを可溶化後 480 nm の吸光度をもとに決定した。脂質および抗体量は、橋本らの方法^(62, 84)により決定した。

3-7 Binding assay

^{14}C 標識した種々のリボソーム検体を 200 μl の 10 % FCS を含む培養液に suspend した標的細胞 (5×10^5 cells) に脂質終濃度 300 μM になるように加え 37 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分反応後、細胞を PBS で 3 回洗浄する。細胞を solune (Packard) で可溶化し、細胞に結合した放射活性を測定した。Competitive binding inhibition assay は、500 μg の mAb を添加し、同様に行った。

3-7 Scatchard plot analysis

B3 mAb および HBJ127 mAb は iodogen 法⁽⁸⁵⁾により ^{125}I 標識した (比放射活性 ;

1×10^4 cpm/ng)。種々の濃度の ^{125}I 標識 mAb を 0.1 % BSA を含む PBS に suspend した標的細胞 (3×10^5) に加え 200 μl とする。4 $^{\circ}\text{C}$ 、60 分反応後、PBS で 3 回洗浄し、細胞に結合した放射活性を測定した。 ^{125}I 標識 mAb の非特異的結合は、1000 倍の非標識 mAb を共存させ同様の操作を行い決定した。

3-8 Cytotoxicity assay

Cytotoxicity assay は標的細胞の [^3H]TdR 取り込みの測定および生細胞の計数により行った。種々の濃度の adriamycin および CIL を 200 μl の 10 % FCS を含む培養液に suspend した標的細胞 (1×10^5) に加え 37 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分 96 well 丸底 plate で反応させる。Plate の各 well を PBS で 3 回洗浄した後、200 μl の 10 % FCS を含む培養液に suspend し、その 20 μl を 96 well 平底 plate に移し 180 μl の 10 % FCS を含む培養液を加え 24 時間培養後 [^3H]TdR 取り込みを測定した。Competitive inhibition assay は、250 μg の mAb の存在下あるいは非存在下に、同様に CIL と標的細胞を反応させる。Plate の各 well を PBS で 3 回洗浄した後、200 μl の 10 % FCS を含む培養液に suspend し、その 20 μl を 24 well plate に移し、1 ml の 10 % FCS を含む培養液を加え 4 日間培養後、トリパンブルーを用いて生細胞を計数した。

謝 辞

本研究にあたり、終始御指導と御鞭撻を賜りました東北大学薬学部教授 橋本嘉幸先生に深く感謝致します。また、有益なる助言をいただきました東北大学薬学部 益子 高博士、鈴木真也修士をはじめ東北大学薬学部衛生化学教室の皆様、並びに順天堂大学医学部免疫学教室 八木田秀雄博士に心から感謝致します。また本研究の一部を担当していただいた田村寿哉学士に感謝致します。

参考文献

- 1) Hashimoto, Y., Masuko, T., Yagita, H., Endho, N., Kanazawa, J., and Tazawa, J. Gann 74, 818 (1983)
- 2) Yagita, H., Masuko, T., Hashimoto, Y. Cancer Res. 46, 1478 (1986)
- 3) Yagita, H., Masuko, T., Takahashi, N., and Hashimoto, Y. J. Immunol. 136, 2055 (1986)
- 4) Yagita, H., and Hashimoto, Y. J. Immunol. 136, 2062 (1986)
- 5) Masuko, T., Abe, J., Yagita, H., and Hashimoto, Y. Jpn. J. Cancer Res. (Gann) 76, 386 (1985)
- 6) Berridge, M. J. Biochem. J. 220, 345 (1984)
- 7) Truneh, A., Albert, F., Golstein, P., and Schmitt-Verhulst, A.M. Nature 313, 318 (1985)
- 8) Isakov, N., and Altman, A. J. Immunol. 135, 3674 (1985)
- 9) Albert, F., Hua, C., Truneh, A., Pierres, M., and Schmitt-Verhulst, A. M. J. Immunol. 134, 3649 (1985)
- 10) Kaibuchi, K., Takai, Y., and Nishizuka, Y. J. Biol. Chem. 260, 1366 (1985)
- 11) Koyasu, S., Suzuki, G., Asano, Y., Osawa, H., Diamanstein, T., and Yahara, I. J. Biol. Chem. 262, 4689 (1987)
- 12) Nishizuka, Y. Nature 308, 693 (1984)
- 13) Nishizuka, Y. Science 233, 305 (1986)
- 14) Wang, T., Sheppard, J. R., and Foker, J. E. Science 201, 155 (1978)
- 15) Atkinson, J. P., Kelly, J. P., Weiss, A., Wedner, H. J., and Parker, C. W. J. Immunol. 121, 2282 (1978)
- 16) Ashman, R. F. In Fundamental Immunology, W. E. Paul, eds. Raven Press, Inc., New York. p. 267 (1984)
- 17) Seamon, K. B., Padgett, W., and Daly, J. W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3363 (1981)
- 18) Conter, T., Williams, J. M., Christenson, L., Shapiro, H. M., Storm, T.

- B., and Strominger, J. J. Exp. Med. 157, 461 (1983)
- 19) Neckers, L. M., and Cossman, J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3494 (1983)
- 20) Kumagai, J.-I., Akiyama, H., Iwashita, S., Iida, H., and Yahara, I. J. Immunol. 126, 1249 (1981)
- 21) Bijsterbosch, M. K., and Klaus, G. G. B. J. Immunol. 137, 1294 (1986)
- 22) Koretzky, G. A., Daniele, R. P., Greene, W. C., and Nowell, P. C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3444 (1983)
- 23) Mills, G. B., Cheung, R. K., Grinstein, S., and Gelfand, E. W. J. Immunol. 134, 1640 (1985)
- 24) Kaibuchi, K., Takai, Y., Ogawa, Y., Kimura, S., Nishizuka, Y., Nakamura, T., Tomomura, A., and Ichihara, A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 104, 105 (1982)
- 25) Novogrodsky, A., Patya, M., Rubin, A. L., and Stenzel, K. H. Biochem. Biophys. Res. Commun. 114, 93 (1983)
- 26) Chouaib, S., Welte, K., Mertelsmann, R., Dupont, B. J. Immunol. 135, 1172 (1985)
- 27) Ledbetter, J. A., Parsons, M., Martin, P. J., Hansen, J. A., Rabinovitch, P. S., and June, C. H. J. Immunol. 137, 3299 (1986)
- 28) Tsudo, M., Kozak, R. W., Goldman, C. K., and Waldman, T. A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 9694 (1986)
- 29) Sanders, M. E., Makgoba, M. W., Sharrow, S. O., Stephany, D., Springer, T. A., Young, H. A., and Shaw, S. J. Immunol. 140, 1401 (1988)
- 30) Haynes, B. F., Hemler, M. E., Mann, D. L., Eisenbarth, G. S., Shelhamer, J., Mostowski, H. S., Thomas, C. A., Strominger, J. L., and Fauci, A. S. J. Immunol. 126, 1409 (1981)
- 31) Hemler, M. E., and Strominger, J. L. J. Immunol. 129, 623 (1982)
- 32) MacDonald, H. R., Less, R. K., Bron, C. J. Immunol. 135, 3944 (1985)
- 33) Posillico, J. T., Srikanta, S., Brown, E. M., and Eisenbarth, G. S. Clin. Res. 33, 385A (1985)

- 34) Michalak, M., Quakenbush, E. J., and Letarte, M. J. Biol. Chem. 261, 92 (1986)
- 35) Teixeira, S., Grandi, S. D., and Kuhn, L. C. J. Biol. Chem. 262, 9574 (1987)
- 36) Quackenbush, E., Clabby, M., Gottesdiner, K. M., Barbosa, J., Jones, N. H., Strominger, J. L., Speck, S., and Leiden, J. M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6526 (1987)
- 37) White, R. A. H., Mason, D. W., Williams, A. F., Galfre, G., and Milstein, C. J. Exp. Med. 146, 664 (1978)
- 38) Brideau, R. J., Carter, P. B., McMaster, W. R., Mason, D. W., and Williams, A. F. Eur. J. Immunol. 10, 609 (1980)
- 39) Dallman, M. J., Mason, D. W., and Webb, M. Eur. J. Immunol. 12, 511 (1982)
- 40) Brenner, M. B., Mclean, J., Scheft, H., Warnke, R. A., Jones, N., and Strominger, J. L. J. Immunol. 138, 1987 (1987)
- 41) Spits, H., Borst, J., Tax, W., Capel, P. J. A., Terhorst, C., and De Vries, J. E. J. Immunol. 135, 1922 (1985)
- 42) Van Wauwe, J. P., de Mey, J. R., and Goossens, J. G. J. Immunol. 124, 2708 (1980)
- 43) Tax, W. J. M., Willems, H. W., Reekers, P. P. M., Capel, P. J. A., Koene, R. A. P. Nature 304, 445 (1983)
- 44) Abo, T., Tilden, A. B., Balch, C. M., Kumagai, K., Troup, G. M., Cooper, M. D. J. Exp. Med. 160, 303 (1984)
- 45) Hara, T., and Fu, S. M. J. Exp. Med. 161, 641 (1985)
- 46) Van Agthoven, A., Terhorst, C., Reinhertz, E., and Schlossman, S. F. Eur. J. Immunol. 11, 18 (1981)
- 47) Haskins, K., Hannum, C., White, J., Roehm, N., Kubo, R., Kappler, J., Marrack, P. J. Exp. Med. 160, 452 (1984)
- 48) Staerz, U. D., Rammensee, H.-G., Benedetto, J. D., and Bevan, M. J. J. Immunol. 134, 3944 (1985)

- 49) Leo, O., Foo, M., Sachs, D. H., Samelson, L. E., and Bluestone, J. A.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1374 (1987)
- 50) Pardoll, D. M., Fowlkes, B. J., Bleustone, J. A., Kruisbeek, A., Maloy, W. L., Coligan, J. E., and Schwartz, R. H. Nature 326, 79 (1987)
- 51) Bluestone, J. A., Pardoll, D., Sharrow, S. O., and Fowlkes, B. J.
Nature 326, 82 (1987)
- 52) Terhorst, C., Alarcon, B., de Vries, J., and Spits, H. In Molecular Immunology Hames, B. D., and Glover, D. M., eds. IRL press, Oxford, England, p145, (1988)
- 53) Brenner, M. B., Mclean, J., Scheft, H., Riberdy, J., Ang, S.-L., Seidman, J. G., Devlin, P., and Krangel, M. S. Nature 325, 689 (1987)
- 54) Alarcon, B., De Vries, J., Pettey, C., Boylston, A., Yssel, H., Terhorst, C., and Spits, H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 3861 (1987)
- 55) Davis, L., Vida, R., and Lipsky, P. E. J. Immunol. 137, 3758 (1986)
- 56) Kammer, G. M., Kurrasch, R., and Scillian, J. J. Cell. Immunol. 87, 284 (1984)
- 57) Van Wauwe, J. P., Goossens, J., and Van Nyen, G. Cell. Immunol. 86, 525 (1984)
- 58) Borst, J., Coligan, J. E., Oettgen, H., Pessano, S., Malin, R., and Terhorst, C. Nature 312, 455 (1984)
- 59) Allison, J. P., and Lanier, L. L. Nature 314, 107 (1985)
- 60) Samelson, L. E., Harford, J. B., and Klausner, R. D. Cell 43, 223 (1985)
- 61) Oettgen, H. C., Pettey, C. L., Maloy, W. L., and Terhorst, C. Nature, 320, 272 (1985)
- 62) Hashimoto, Y., Sugawara, M., Masuko, T., and Hojo, H. Cancer, Res. 43, 5328 (1983)
- 63) Machy, P., and Leserman, L. D. Biochim, Biophys. Acta 730, 313 (1983)
- 64) Heath, T. D., Montgomery, J. A., Piper, J. R., and Papahadjopoulos, D.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1377 (1983)

- 65) Wolff, B., and Gregoriadis, G. Biochim. Biophys. Acta 802, 259 (1984)
- 66) Bally, M. B., Hope, M. J., Van Echteld, C. J. A., and Cullis, P. R.
Biochim. Biophys. Acta 812, 66 (1985)
- 67) Mayer, L. D., Bally, M. B., Hope, M. J., and Cullis, P. R. Biochim.
Biophys. Acta 816, 294 (1985)
- 68) Pastan, I., Willingham, M. C., and FitzGerald, D. J. P. Cell 47,
641 (1986)
- 69) Huang, A., Kennel, S. J., and Huang, L. J. Biol. Chem. 258, 14034
(1983)
- 70) Ho, R. J. Y., Rouse, B. T., and Huang, L. J. Biol. Chem. 262, 13973
(1987)
- 71) Jefferies, W. A., Brandon, M. R., Williams, A. F., and Hunt, S. V.
Immunology 54, 333 (1985)
- 72) Paterson, D. J., Jefferies, W. A., Green, J. R., Brandon, M. R.,
Corthesy, P., Puklavec, M., and Williams, A. F. Mol. Immunol. 24, 1281
(1987)
- 73) Uchiyama, T., Broder, S., and Waldmann, T. A. J. Immunol. 126, 1393
(1981)
- 74) Julius, M. H., Simpson, E., and Herzenberg, L. A. Eur. J. Immunol. 3,
64 (1973)
- 75) Noda, M., and Hashimoto, Y. Jpn. J. Urol. 64, 397 (1973)
- 76) Williams, A. F., Barclay, A. N., Clark, S. J., Paterson, D. J., and
Willis, A. C. J. Exp. Med. 165, 368 (1987)
- 77) Robinson, A. P., Puklavec, M. and Mason, D. W. Immunology 57, 527
(1986)
- 78) Matsuura, A., Ishii, Y., Yuasa, H., Narita, H., Kon, S., Takami, T.,
and Kikuchi, K. J. Immunol. 132, 316 (1984)
- 79) Masuko, T., Yagita, H., and Hashimoto, Y. JNCI 72, 523 (1984)
- 80) Brenner, M. B., Trowbridge, I. S., and Strominger, J. L. Cell 40, 183
(1985)

- 81) Lee, W. T., and Conrad, D. H. J. Immunol. 134, 518 (1985)
- 82) Sakura, Y., Ogiu, T., Imamura, N., Furuta, K., Matsuoka, C., and Odashima, S. JNCI 73, 757 (1984)
- 83) Carlsson, J., Drevin, H., and Axen, R. Biochem. J. 173, 723 (1978)
- 84) Hashimoto, Y., Sugawara, M., and Endoh, H. J. Immunol. Methods 62, 155 (1983)
- 85) Fraker, P. J., and Speck Jr., J. C. Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 849 (1978)